

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 7 月 1 日 (01.07.2004)

PCT

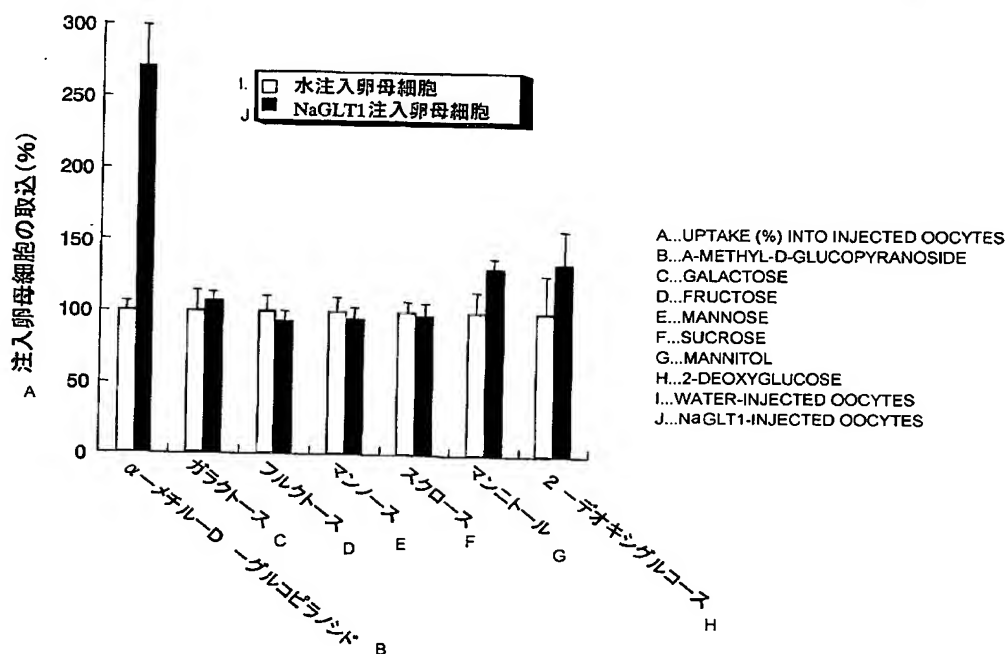
(10) 国際公開番号
WO 2004/055184 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, 5/10, C12Q 1/68, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02, C12Q 1/02, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/566, 37/00, A01K 67/027, A61K 31/7088, 38/00, 48/00, A61P 3/10, 13/12, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015418
- (22) 国際出願日: 2003 年 12 月 2 日 (02.12.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-363014
2002 年 12 月 13 日 (13.12.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 乾 賢一 (INUI, Ken-ichi) [JP/JP]; 〒606-8107 京都府 京都市左京区 高野東開町 1-2-3 東大路高野第 3 住宅 4 3 棟 205 号 Kyoto (JP). 増田 智先 (MASUDA, Satoshiro) [JP/JP]; 〒606-0931 京都府 京都市左京区 松ヶ崎井手ヶ海道町 5-1-403 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052 東京都 港区 赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CA, JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- 規則 4.17 に規定する申立て:
— CA, JP, US の指定のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

[続葉有]

(54) Title: GLUCOSE AND/OR FRUCTOSE TRANSPORTER NaGLT1 AND ITS GENE

(54) 発明の名称: グルコース及び/又はフルクトーストランスポータ NaGLT1 及びその遺伝子



(57) Abstract: It is intended to provide a novel glucose and/or fructose transporter relating to renal diabetes, its gene, mutants thereof and utilization of the same. The above-described glucose and/or fructose transporter and its gene are a glucose and/or fructose transporter and its gene relating to renal diabetes and the protein and the gene respectively comprise a novel protein which is highly expressed in the kidney and largely contributes to the glucose reabsorption in the kidney and its gene. Moreover, mutants of the protein and the gene as described above and an antibody binding specifically to the protein are included.

[続葉有]



添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

Furthermore, a nonhuman model animal lacking the above-described gene on chromosome, a method of screening a preventive/a remedy for renal diabetes, a method of diagnosing a glucose and/or fructose transporter function or a renal disease by using the gene or the antibody as described above, and a method of controlling the transporter function of tissue cells by transferring the above gene into the tissue cells are included.

(57) 要約: 腎性糖尿病に関与する新規グルコース及び／又はフルクトーストランスポータ、その遺伝子、及びそれらの変異体、及び、それらの利用を提供するものである。本発明のグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ及びその遺伝子は、腎性糖尿病に関与するグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ及びその遺伝子であり、該タンパク質及び遺伝子は、腎臓で高発現し、腎でのグルコース再吸収において、より大きな寄与を果たす新規タンパク質及びその遺伝子からなる。本発明は、該タンパク質及び遺伝子の変異体、及び該タンパク質に特異的に結合する抗体を包含する。更に、本発明は、本発明の遺伝子を染色体上で欠損させたモデル非ヒト動物、腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニング方法、該遺伝子や抗体を用いたグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能や腎疾患の診断方法や本発明の遺伝子を組織細胞に導入して該組織細胞のトランスポータ機能を調節する方法も包含する。

明 細 書

グルコース及び／又はフルクトーストランスポータ N a G L T 1 及びその遺伝子

5

技術分野

本発明は、グルコース及び／又はフルクトーストランスポータ、その遺伝子、その変異体、及びそれらの利用に関する。

10 背景技術

ヒトの腎臓は2つ合わせても体重のわずか0.5%に過ぎないが、心拍出量の約20%、即ち毎分1~1.2Lもの血液が流れ込んでいる。その血漿流量の約20%、即ち毎分120mL（1日200L）が糸球体で濾過され原尿となるが、その99%は尿細管で再吸収され、残りの1.5~2Lが1日の尿量となる。腎臓は機能単位であるネフロンとそれを取りまく血管系から構成されている。ネフロンは糸球体に始まり、近位尿細管、中間部尿細管（ヘンレループ細脚）、遠位尿細管を経て集合管系に至る。それぞれの分節は異なった機能と形態を有し、協同的に尿の濃縮・生成に関与している。特に、近位尿細管を構成する細胞では管腔側刷子縁膜の発達により表面積が大きいため、原尿中の水や電解質の他低分子性の栄養物質を再吸収したり、血液中の薬物や異物を分泌する際に効率的な形態となっている（月刊薬事 Vol.43, No.3, pp29-34, 2001、月刊薬事 Vol.42, No.4, pp113-120, 2000）。

近位尿細管上皮細胞の血液側側底膜と管腔側刷子縁膜には、このように多様な物質の再吸収と分泌を媒介するトランスポータ（輸送体）が局在し、方向選択的な物質輸送を可能とするネットワークが形成されてい

る (BIO Clinica, 11, 22-25, 1996、生体の科学、50, 268-273, 1999)。
この数年間に、グルコースの腎排泄調節を司るグルコーストランスポー
タの遺伝子のクローニングと、構造・機能解析が著しく進展し、腎臓に
おいて、糸球体で尿中へ移行したグルコースが、再吸収されて血液中へ
5 戻される機構が分子レベルで明らかにされつつある。

即ち、血中グルコースは腎糸球体で濾過され、尿細管で再吸収を受け
る。この機構により正常血糖時には、グルコースは100%再吸収され
循環血中に戻る。

そこで、グルコースやアミノ酸等の水溶性分子やイオンは、リン脂質
10 二重層からなる生体膜を速やかに通過することができないために、一般
的には、細胞膜や膜小器官にはこれらの分子を特異的に輸送するための
輸送タンパク質が存在する。このような細胞内外の物質輸送を行う膜タ
ンパク質が、トランスポーターであるが、トランスポーターは、体内に取り
こまれた薬物、栄養物等が各組織に移動する過程や、各組織に蓄積した
15 老廃物の排出に関与している (特開2002-171980号公報)。腎
臓においては、近位尿細管上皮細胞の血液側側底膜と管腔側刷子縁膜に、
多様な物質の再吸収と分泌を媒介するトランスポーター (輸送タンパク質)
が局在し、細胞内外に形成された膜電位差やPH勾配等の環境特性を巧
みに利用した方向選択的な物質輸送を可能とするネットワークが形成さ
20 れている (BIO Clinica, 11, 22-25, 1996、生体の科学、50, 268-273,
1999)。

脊椎動物のグルコーストランスポーターは、大きく2種類に分けられる。
1つは促進グルコーストランスポーター (facilitated glucose
transporter: GLUT) とよばれるもので、細胞内外のグルコース濃度
25 勾配にしたがって輸送を行う促進拡散型の輸送担体である。このタンパ
ク質はさらに8つのアイソフォームが存在し、分子量約50,000の

1 2 回膜貫通型タンパク質である (Annu. Rev. Physiol. 55, 591-608, 1993, TIBS 23, 476-481, 1998, 特開 2 0 0 2 - 2 1 8 9 8 1 号公報)。基本的に、すべての細胞は少なくとも 1 つのタイプの G L U T を発現させ、それによって必要なグルコースを細胞外から得ている。もう 1 つは、
5 N a ⁺ / グルコーストランスポータ (N a ⁺-glucose cotransporter : S G L T) で、N a イオンと共役することでグルコースを濃度勾配に逆らって輸送する能動輸送担体であり、分子量約 7 5 , 0 0 0 の 1 4 回膜貫通型タンパク質である。

このタンパク質は小腸と腎臓の管腔 (lumen) 側に面した上皮細胞の頂
10 端側細胞膜 (apical membrane) に存在し、細胞内外の N a ⁺ の電気化学ポテンシャルの勾配を利用してグルコースを細胞内へ取り込む能動輸送を行っている (Physiol. Rev. 74, 993-1026, 1994, Am. J. Physiol. 276, (5 Pt 1), G1251-1259, 1999, 特開 2 0 0 2 - 2 1 8 9 8 1 号公報)。S G L T によって上皮細胞内に取り込まれたグルコースと N a ⁺ は、側底
15 膜 (baso-lateral membrane) に存在する G L U T - 2 と N a ⁺ - K ⁺ ポンプの働きで血中へ放出される。

哺乳類の S G L T は、輸送特性によって更に、S G L T - 1 と S G L T - 2 の二つのタイプに分類される。S G L T - 1 は、糖 1 分子あたり 2 個の N a ⁺ イオンを輸送し、グルコースとガラクトースに対して高い
20 親和性を持ち、小腸と腎臓で発現している。一方、S G L T - 2 は糖 1 分子あたり 1 個の N a ⁺ イオンを輸送し、グルコースに対する親和性は低く、ガラクトースは運ばない。このタンパク質は腎臓で発現しているが、小腸での発現は確認されていない。更に、S G L T - 1 と S G L T - 2 は腎臓の異なる場所で機能している。糸球体で尿中へ移行したグル
25 コースは、その多くが、まず近位尿細管の S G L T - 2 で再吸収され、更に遠位尿細管の S G L T - 1 で完全に再吸収され血液中へ戻される。

これに対して、食物中のグルコースは総て、小腸の SGLT-1 で体内へ吸収されている。

5 このように、腎臓にはグルコーストランスポータ SGLT 1 及び SGLT 2 が発現しており、糸球体で濾過されたグルコースの尿細管上皮細胞内への再吸収過程は、これら 2 種類のトランスポータによって媒介されると考えられている。

10 一方で、腎性糖尿病とされる、血漿中のグルコースの濃度が正常域 (170 mg/dL 以下) であるのに、明らかな糖尿の見られる状態がある。糸球体を通過したグルコースが尿細管で再吸収され得る最大速度 (TmG で表す) は正常人では毎分 350 mg であるが、これが異常に低い場合が最も多い。その結果、血漿中のグルコース濃度の高低に関係なく尿中のグルコース濃度が異常に高くなる。この現象は、近位尿細管の異常、即ち先天的あるいは後天的ファコンニ症候群のときやフロリジン注射の後などにも見られる。もう一つの腎性糖尿病の原因としては、グルコースのみかけ上の閾値が低下しているが閾値の平均値と TmG との両者がまったく正常という場合もある。この場合に見られるグルコースの尿中への異常な排泄増加は、グルコースの血漿濃度が低い時のみに存在する。そして、最大閾値を越えた血漿レベルでのグルコースの排泄はかえって正常である (医学大辞典 第 18 版, pp 1059~1060, 南山堂, 1998 年、生化学辞典 第 2 版, pp 673, 東京化学同人, 1990 年)。

20 腎性糖尿病は、腎臓におけるグルコース再吸収不全によると考えられており、かかるグルコース再吸収不全は、腎臓において糸球体で濾過されたグルコースの尿細管上皮細胞内への再吸収過程を媒介していると考えられている既知の 2 種類のトランスポータ、即ち、SGLT 1 及び SGLT 2 の先天性或いは後天性の欠損に起因すると考えられている。し

かしながら、未だ原因遺伝子については同定されておらず、該既知の SGLT 1 及び SGLT 2 遺伝子とそれ以外の未知のトランスポータ遺伝子の先天的或いは後天的欠損によって引き起こされると考えられてきた。

また、腎疾患を、標的或いは回避することを目的とした医薬品の開発は、腎疾患時における薬物療法をより有効かつ安全に実施するために重要であるが、今までの腎疾患の原因の解明に対する技術的な研究基盤が乏しいために、有効な成功例がないのが現状である。

本発明の課題は、腎において発現し、腎でのグルコース再吸収に関与する新規グルコーストランスポータ、その遺伝子、及びそれらの変異体、
10 更にはそれらの利用を提供することにある。

腎性糖尿病は、腎臓におけるグルコース再吸収不全によるものであり、かかる不全は既知のグルコーストランスポータ遺伝子 SGLT 1 及び SGLT 2 の先天性或いは後天性の欠損に起因すると考えられていたが、その原因遺伝子については、同定されないできた。本発明者は、この未
15 同定の遺伝子について、鋭意探索の結果、既知の SGLT 1 及び SGLT 2 グルコーストランスポータ遺伝子とは別の腎臓で高発現する遺伝子を見い出し、本発明を完成するに至った。

本発明のグルコーストランスポータは、既知の SGLT 1 及び SGLT 2 よりも高い発現量を有し、腎でのグルコース再吸収において、より
20 大きな寄与を果たすとともに、グルコースを特異的に認識するという特性を有する。本発明のグルコーストランスポータを、「グルコーストランスポータ NaGLT 1」と命名した。更に、検討した結果、本発明の NaGLT 1 は、Na⁺依存的なフルクトーストランスポータ機能を有することを見い出した。

25 本発明は、また、グルコース及び／又はフルクトーストランスポータ NaGLT 1 及びその遺伝子の変異体、及び該グルコース及び／又はフ

ルクトーストランスポータN a G L T 1 に特異的に結合する抗体を包含する。更に本発明は、本発明のグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能を染色体上で欠損させた腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物及び該モデル非ヒト動物を用いた腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニング、更には、本発明の遺伝子や抗体を用いたグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能や腎疾患の診断方法やそのための診断薬を包含するものである。また、本発明は、アンチセンス鎖DNA等を用いて、本発明の遺伝子の発現を制御し、動物組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を調節する方法も包含するものである。

発明の開示

すなわち具体的には本発明は、配列表の配列番号 1 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなることを特徴とするDNA（請求項 1）や、請求項 1 記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチドをコードすることを特徴とするDNA（請求項 2）や、以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードするDNA；(a)配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(b)配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチド（請求項 3）や、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とするポリペプチド（請求項 4）や、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され

たアミノ酸配列からなり、かつグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能を有するポリペプチド（請求項５）や、請求項１～３記載のＤＮＡを、発現ベクターに組み込み、該組換え発現ベクターを宿主細胞に導入して発現することを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能を有するポリペプチドの製造法（請求項６）や、請求項４又は５記載のポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体（請求項７）や、抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項７記載の抗体（請求項８）や、抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項７記載の抗体（請求項９）からなる。

また本発明は、請求項１～３のいずれか記載のＤＮＡを動物組織細胞に導入することを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法（請求項１０）や、動物組織細胞が、ラット腎臓の組織細胞、ブタ腎臓由来上皮細胞、イヌ腎臓由来上皮細胞、又はフクロネズミ腎臓由来上皮細胞であることを特徴とする請求項１０記載のグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法（請求項１１）や、動物組織細胞が、ヒト胎児腎臓の形質転換細胞株ＨＥＫ２９３であることを特徴とする請求項１０記載のグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法（請求項１２）や、請求項１０～１２のいずれか記載の方法により製造されたことを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞（請求項１３）や、請求項１３記載のグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞を用いて、被研物質のグルコース輸送機能への影響を

測定することを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランス
ポータ機能調節活性を有する物質のスクリーニング方法（請求項 14）
や、配列表の配列番号 2 に示されるグルコース及び／又はフルクトース
トランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能を染色
5 体上で欠損させたことを特徴とする腎におけるグルコース再吸収能不全
に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物（請求項 15）や、
グルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペ
プチドを発現する遺伝子機能の欠損が、配列表の配列番号 1 に示される
グルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペ
10 プチドを発現する遺伝子の機能の欠損であることを特徴とする請求項 1
5 記載の腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物（請求項 16）や、請
求項 15 又は 16 記載の腎におけるグルコース及び／又はフルクトース
再吸収能不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物に、被
検物質を投与し、該モデル非ヒト動物、或いは該モデル非ヒト動物の細
15 胞、組織又は器官におけるグルコース再吸収能を測定・評価することを
特徴とするグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病予防・治療薬
のスクリーニング方法（請求項 17）や、請求項 1 記載の塩基配列のア
ンチセンス鎖の全部又は一部からなるグルコース及び／又はフルクトー
ストランスポータ機能診断用プローブ（請求項 18）や、請求項 1～3
20 のいずれか記載の DNA の少なくとも 1 つ以上を固定化させたことを特
徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能診断用
マイクロアレイ又は DNA チップ（請求項 19）からなる。

さらに本発明は、請求項 7～9 のいずれか記載の抗体及び／又は請求
項 18 記載の診断用プローブを用意することを特徴とするグルコース及
25 び／又はフルクトーストランスポータ機能診断用薬剤（請求項 20）や、
被検組織から試料を得、該試料における請求項 1 記載の遺伝子の発現を

測定することを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の診断方法（請求項 2 1）や、請求項 2 1 記載の遺伝子の発現の測定を、請求項 1 8 記載のグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能診断用プローブ、或いは請求項 1 9 記載のグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能診断用マイクロアレイ又は DNA チップを用いて行うことを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の診断方法（請求項 2 2）や、被検組織から試料を取得、培養し、該試料における遺伝子の発現により生成される請求項 4 記載のポリペプチドを測定することを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の診断方法（請求項 2 3）や、請求項 2 3 記載のポリペプチドの測定を、請求項 7 ～ 9 のいずれか記載の抗体を用いて行うことを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の診断方法（請求項 2 4）や、請求項 2 1 ～ 2 4 のいずれか記載のグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の診断が、腎疾患におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の測定であることを特徴とする腎疾患の診断方法（請求項 2 5）や、動物組織細胞に、請求項 1 ～ 3 のいずれか記載の DNA を導入することを特徴とする動物組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の調節方法（請求項 2 6）や、動物組織細胞における請求項 1 記載の DNA の発現を抑制することを特徴とする動物組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の調節方法（請求項 2 7）や、動物組織細胞における請求項 1 記載の DNA の発現の抑制が、請求項 1 記載の DNA 塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部を動物組織細胞に導入することにより行われることを特徴とする動物組織細胞グルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の調節方法（請求項 2 8）や、動物組織細胞が、動物腎細

胞であることを特徴とする請求項 26～28 のいずれか記載の動物組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能の調節方法（請求項 29）からなる。

5 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明の実施例において、A は本発明の NaGLT1 の塩基配列及びアミノ酸配列を、B は本発明の NaGLT1 のアミノ酸配列のハイドロパシープロット（疎水性分析）を示す図である。

10 第 2 図は、本発明の実施例において、A は本発明のラット細胞における NaGLT1 mRNA のノーザンプロット分析を、B は本発明のラット細胞における NaGLT1 mRNA を PCR により検出したことを示す写真である。

15 第 3 図は、本発明の実施例における、本発明の NaGLT1、SGLT1、SGLT2 及び GAPDH の mRNA を PCR により検出し、それぞれの mRNA について腎臓内での発現分布を示す写真である。なお、図中の + は逆転写酵素を含む条件で、- は逆転写酵素を含まない条件で RT-PCR を行ったものをそれぞれ示す。

20 第 4 図は、本発明の実施例における、本発明の NaGLT1、SGLT1 及び SGLT2 mRNA の発現量をリアルタイム PCR によって定量解析したことを示す図である。

第 5 図は、本発明の実施例における、本発明の NaGLT1 mRNA をインビトロ合成し、注入した卵母細胞と、水注入卵母細胞における各種糖類蓄積を示す図である。

25 第 6 図は、本発明の実施例において、A は本発明の NaGLT1 発現卵母細胞における $[^{14}\text{C}]\alpha\text{MeGlc}$ 蓄積量と αMeGlc 自身の依存関係を、B は A のデータを用いた Hill プロットを、C は $[^{14}\text{C}]\alpha\text{M}$

e G l c 蓄積量と細胞外 N a ⁺ イオン濃度の依存関係を、D は C のデータを用いた Hill プロットを示す図である。

第 7 図は、本発明の実施例における、本発明の N a G L T 1 発現卵母細胞及び水注入卵母細胞における、[¹⁴C] α M e G l c 蓄積に対する各種糖類の影響を示す図である。

第 8 図は、本発明の実施例における、ラット腎臓膜部位（腎粗膜、刷子縁膜、及び側底膜）における N a G L T 1 タンパク質の細胞内局在を、イムノプロットにより解析した結果を示す写真である。

第 9 図は、本発明の実施例における N a G L T 1 が媒介する H E K 2 9 3 細胞によるフルクトースの取込みについて、(A) は、糖類似体を含む緩衝液とともに 1 5 分間、3 7 °C でインキュベーションした H E K 2 9 3 細胞について、(B) は、N a G L T 1 c D N A でトランスフェクトした H E K 2 9 3 細胞による [¹⁴C] フルクトースの取込みについて、示したグラフである。

第 1 0 図は、本発明の実施例における腎臓刷子縁膜小胞によるフルクトースの取込みについて、(A) は、マンニトール及び H E P E S に懸濁した膜小胞を、マンニトール及び H E P E S を含む基質混合液とともに、2 5 °C でインキュベーションした取込みについて、(B) は、フルクトースの N a ⁺ 依存性の取込みを、インキュベーション緩衝液中、各種濃度における取込みについて、示したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

（本発明の遺伝子、該遺伝子によってコードされるポリペプチド及びその抗体）

本発明は、腎性糖尿病の原因に関与するグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ N a G L T 1 及びその原因遺伝子、更にはそれら

の変異体からなる。

本発明の腎性糖尿病の原因に関与するグルコース及び／又はフルクトーストランスポータNaGLT1 cDNAは、配列表の配列番号1に示される塩基配列を有する。また、該cDNAによって、コードされるグル
5 グルコース及び／又はフルクトーストランスポータNaGLT1タンパク質は、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドからなる。本発明において取得された新規遺伝子であるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータNaGLT1のcDNAは、2, 173の塩基対からなり、その翻訳領域(111～1562番目)には、
10 484個のアミノ酸残基からなるポリペプチドがコードされている。

本発明のグルコース及び／又はフルクトーストランスポータNaGLT1は、疎水性解析の結果からは、11回膜貫通型の糖タンパク質であることが確認された。本発明の該グルコース及び／又はフルクトースト
15 ランスポータNaGLT1は、腎臓において高発現するグルコース及び／又はフルクトーストランスポータであり、他の単糖類は認識せずグルコース及び／又はフルクトースを特異的に認識する。腎臓におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータNaGLT1の発現量は、既知のグルコーストランスポータSGLT1やSGLT2よりも高く、
腎性糖尿病の原因と考えられている腎臓でのグルコースの再吸収に大きな寄与を果たしているものである。
20

本発明の遺伝子としては、前記配列表の配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列、更には、該塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有
25 するポリペプチドをコードするDNA配列、及び、次の(a)又は(b)のポリペプチドをコードするDNA；

(a)配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
(b)配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは
数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、
かつグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能を有するポリ
5 ペプチドを有するポリペプチド、を含むものである。

本発明において、種々のDNA配列の変異は、周知の遺伝子工学的遺
伝子変異手段によって、行うことができる。

なお、上記本発明の塩基配列において、「塩基配列とストリンジェント
な条件下でハイブリダイズする」条件としては、例えば、42℃でのハイ
10 ブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝
液による42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリ
ダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液
による65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、
15 ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素とし
ては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば種々の要
素を組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジ
ェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。

更に、本発明は、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からな
るポリペプチド、該配列表の配列番号に示されるアミノ酸配列において、
20 1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配
列からなり、かつグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機
能を有するポリペプチドを含むものである。本発明のポリペプチドを取
得するには、公知の遺伝子工学の技術を用いて取得することができる。
即ち、本発明の遺伝子を適宜公知の発現ベクターに組込み、該組換えベ
25 クターを宿主細胞に導入し、発現することによって取得することができ
る。

(本発明のポリペプチドによって誘導される抗体の利用)

更に、本発明は、本発明のポリペプチドによって誘導され、該ポリペ
プチドに特異的に結合する抗体を含む。該抗体としては、モノクローナ
5 ル抗体及びポリクローナル抗体を挙げることができる。該抗体の作製は、
本発明のポリペプチドを抗原として、常法により作製することができる。
本発明の抗体は、本発明のグルコース及び／又はフルクトーストランス
ポータ機能を有するポリペプチドとの抗原抗体反応により、本発明遺伝
子の腎組織細胞等における発現の有無の検出に利用することができ、該
10 遺伝子に関わる腎疾患の診断に利用することができる。本発明の抗体を
用いた免疫学的測定には、例えばRIA法、ELISA法、蛍光抗体法
等公知の免疫学的測定法を用いることができる。

(本発明のDNAを導入したヒト組織細胞の利用)

15 本発明のDNAを、ヒト組織細胞に導入して、グルコース及び／又は
フルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現するヒト
組織細胞を製造することができる。該ヒト組織細胞としては、本来Na
G1T1が強く発現している腎臓の組織細胞を用いることが好ましく、
該腎臓の組織細胞の具体例としては、ヒト胎児腎臓の形質転換細胞株H
20 EK293を挙げることができる。また、本発明の遺伝子を導入する動
物組織細胞としては、ラットの腎臓の組織細胞や、ブタ腎臓由来上皮細
胞LLC-PK₁、イヌ腎臓由来上皮細胞MDCK、フクロネズミ
腎臓由来上皮細胞OKのいずれかの細胞を用いることもできる。本発
明のDNAをヒト組織細胞に導入するには、トランスフェクション法等、
25 適宜の遺伝子導入法を用いることができる。

(本発明の遺伝子及び該遺伝子によってコードされるポリペプチドの利用)

本発明において、ヒト腎細胞からクローニングしたN a G l T 1の新規遺伝子は、該塩基配列のアンチセンス鎖を用いることにより、診断用
5 プローブとして、腎組織細胞のグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の診断に用いることができる。また、該診断用プローブや前記本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いて、グルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の診断薬として、及び該診断薬を装備した診断用キットとして利用することができる。

- 10 更に、本発明のDNAを、少なくとも1つ以上デバイス上に固定して、グルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の診断用マイクロアレイ又はDNAチップとして利用することができる。該マイクロアレイ及びDNAチップには、グルコース及び／又はフルクトーストランスポートの他の遺伝子等を合わせて固定し、診断に用いることができる。
- 15 また、腎組織細胞における本発明の遺伝子の発現の状態を測定するには、R T - P C R法やノーザンブロッティング法等、公知の遺伝子の測定法を適宜用いることができる。本発明の診断法を用いて、腎組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポートN a G L T 1の遺伝子の発現の有無や発現の強度を測定することにより、ヒト腎臓にお
20 ける遺伝子疾患を検出することができる。

(本発明の遺伝子を用いたグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の調節)

- 25 ヒト組織細胞における本発明の遺伝子の発現の制御により、ヒト組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の調節を行うことができる。ヒト組織細胞における遺伝子の発現の制御は、

- ヒト組織細胞への本発明遺伝子の導入や、本発明遺伝子に対するアンチセンス鎖の導入による本発明遺伝子の発現抑制によって行うことができる。ヒト組織細胞への本発明遺伝子の導入方法としては、トランスフェクション法等の公知の遺伝子導入法を用いることができる。アンチセンス鎖のヒト組織細胞への導入には、この分野で通常用いられる方法を用いることができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、腎組織等のヒト組織細胞へ直接投与することができる。また、必要に応じて薬学的に許容される細胞内導入試薬、例えば、リポフェクチン試薬、リポフェクトアミン試薬、DOTAP試薬、Tfx試薬、リポソーム及び高分子担体等と共に投与することができる。

腎臓等のヒト組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポート機能の調節により、腎臓等における遺伝子疾患の予防・治療が可能となる。

15 (本発明の遺伝子欠損モデル非ヒト動物及びその利用)

- 本発明の、腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物とは、グルコース及び／又はフルクトーストランスポートNaGLT1遺伝子機能が染色体上で欠損することにより、腎臓におけるグルコース及び／又はフルクトース再吸収不全のような腎性糖尿病を発症する非ヒト動物をいう。本発明における非ヒト動物としては、ラット、マウス、モルモット等の齧歯目動物を具体的に挙げることができ、本発明の腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニングに用いるモデル非ヒト動物としては、マウス、ラットが特に有利に利用することができるが、これらに限定されるものではない。

- 25 本発明のNaGLT1遺伝子機能が染色体上で欠損したモデル非ヒト動物の作製は、公知の遺伝子欠損モデル非ヒト動物の作製方法を用いて

作製することができる。以下に、N a G L T 1 遺伝子機能が染色体上で欠損したモデル非ヒト動物の作製方法を、N a G L T 1 遺伝子機能が染色体上で欠損したマウスを例にとって説明する。

5 N a G L T 1 遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわちホモ接合体変異マウス（－／－）は、例えば、ラット腎臓から構築したラット遺伝子ライブラリーより得られた遺伝子断片を用いて、N a G L T 1 遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされたN a G L T 1 遺伝子
10 の一部又は全部を、例えばl a c－Z 遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等のマーカー遺伝子で置換し、必要に応じて、5' 末端側にジフテリアトキシンAフラグメント（D T－A）遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（H S V－t k）遺伝子等の遺伝子を導入してターゲッティングベクターを作製し、この作製されたターゲッティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション（電気穿孔）法等によってE S 細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、X
15 －g a l による染色あるいはG 4 1 8 やガンシクロビル（G A N C）等の抗生物質に抵抗性を示すE S 細胞を選択する。この選択されたE S 細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。

上記組換えE S 細胞をマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクション
20 し、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体変異マウス（＋／－）を得ることができ、また、このヘテロ接合体変異マウスをインタークロスさせることによって、ホモ接合体変異マウス（－／－）を得ることができる。そして、かかるホモ接合体変異マウスにN a G L T 1 遺伝子が欠損しているかどうかを確認する方法として
25 は、例えば、このマウスのN a G L T 1 遺伝子の発現をウエスタンブロッ

ット法等により調べる方法がある。

本発明における、腎臓におけるグルコース再吸収不全に起因する腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニングは、グルコース及び／又はフルクトーストランスポータNaGLT1遺伝子機能の染色体上での欠損により、腎臓におけるグルコース及び／又はフルクトース再吸収不全のよ
5 うな腎性糖尿病を発症する非ヒト動物に、被検物質を投与し、該モデル非ヒト動物、或いは該モデル非ヒト動物の細胞、組織又は器官における及び／又はフルクトースグルコース再吸収能を測定・評価することにより行う。

- 10 上記のように、腎臓におけるグルコース及び／又はフルクトース再吸収不全に起因する腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニングをする際、野生型非ヒト動物及び／又はNaGLT1遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物を用いて、グルコース及び／又はフルクトース再吸収不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物の場合と比較・評
15 価することが好ましく、野生型非ヒト動物としては、上記NaGLT1遺伝子機能が染色体上で欠損したモデル非ヒト動物と同種の動物を意味し、中でも同腹の動物を好適に例示することができ、NaGLT1遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物は、文献(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6132-6137, 2000)記載の方法等によって作製することができる。
- 20 NaGLT1遺伝子機能欠損型と、それらの同腹の野生型は、個体レベルで正確な比較実験・評価(解析)等を行うことができる点で同時に用いることが好ましい。

- (本発明の遺伝子を用いたグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能の調節)
- 25

動物組織細胞、特に腎臓における組織細胞における本発明の遺伝子の

発現の制御により、動物組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能の調節を行うことができる。動物組織細胞における遺伝子の発現の制御は、動物組織細胞への本発明遺伝子の導入や、本発明遺伝子に対するアンチセンス鎖並びに s i R N A の導入による本
5 発明遺伝子の発現抑制によって行うことができる。動物組織細胞への本発明遺伝子の導入方法としては、トランスフェクション法等の公知の遺伝子導入法を用いることができる。アンチセンス鎖の動物組織細胞への導入には、この分野で通常用いられる方法を用いることができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、腎組織等の動物組織細胞へ直
10 接投与することができる。また、必要に応じて薬学的に許容される細胞内導入試薬、例えば、リポフェクチン試薬、リポフェクトアミン試薬、D O T A P 試薬、T f x 試薬、リポソーム及び高分子担体等と共に投与することができる。

腎臓等の動物組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトースト
15 ランスポータ機能の調節により、腎性糖尿病等における遺伝子疾患の予防・治療が可能となる。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

20 [実施例]

(グルコース及び／又はフルクトーストランスポータ N a G L T 1 の c D N A クローニング)

ラット腎臓より、塩化セシウム密度勾配遠心法により全 R N A を抽出し、この全 R N A からオリゴ d T セルロース (Stratagene 社製) を用い
25 てポリ A + R N A (m R N A) を精製した。精製した m R N A は、c D N A ライブラリー作製キット (Stratagene 社製) を用いてラット腎 c D

NAライブラリーを作製した。このcDNAライブラリーから、無作為に1,000遺伝子を取り出し、ベクタープライマー(T3プライマー; 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3')を用いてシーケンスを行った。なお、NaGLT1の全長シーケンスについては、下記の表1に記載のとおりプライマー(配列表の配列番号3~12)を設計し(Proligo社に合成依頼)、RISA-384(島津社製)を用いたチェーンターミネーター法により解読を行い、GENETYX-MAC Version 10(SOFTWARE DEVELOPMENT社製、東京)を用いて配列表を作成した。実際のシーケンスは、RISA-384システムにより行った(島津ジェノミックリサーチ(株)に委託解析)。

(表1)

プライマー名	塩基配列(5'→3')	NaGLT1における位置	配列番号
フォワードプライマー:			
T3-1	TCGGAAATGGAGTTCCGTGG	105-124	3
T3-2	AGCTGCCTTACTGACTGCCATG	494-515	4
T3-3	TACGTATTCTCCTTCGCCACC	996-1016	5
T3-4	TGTGTAACATTGGCAGCCTGG	1144-1164	6
T3-5	TAACCCATAGCTGAGGTCTC	1699-1718	7
リバースプライマー:			
T7-1	CAGATAGTTGTGAGCCACCATGTG	2095-2072	8
T7-2	GAGTTGCTTAGAGACCTCAGC	1728-1708	9
T7-3	AGGTGGTGTACTGCTCAATCC	1293-1273	10
T7-4	TCTGAGGCGGCTTCAAAGGATC	757-737	11
T7-5	AAAAGCACCCACCAACCACAG	409-388	12

得られた遺伝子配列情報について、GenBank、EMBL、DDBJ及びPDBの各データベースに登録されている遺伝子配列との相同性解析をBLASTにより行い既知群と未知群に分けた。未知遺伝子約200種は、mRNAをmCap RNA Capping kit(Stratagene社製)を用いてインビトロ合成し、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた輸送実験を行った。その結果、代謝抵抗性の α -メチルーD-グルコピラノシド(α MeGlc)

を特異的に輸送するクローン (N a G L T 1) を同定した (GeneBank アクセションナンバー: A B 0 8 9 8 0 2)。単離された N a G L T 1 c D N A は 2, 1 7 3 塩基対からなり (配列番号 1)、その翻訳領域 (1 1 1 ~ 1 5 6 2 番目) には 4 8 4 個のアミノ酸残基からなるタンパク質 (配列番号 2) がコードされていた (第 1 図 A)。疎水性解析の結果から、N a G L T 1 は 1 1 回膜貫通型の糖タンパク質であることが推測された (第 1 図 B)。

10 (ノーザンブロット法及び R T - P C R による N a G L T 1 の発現分布の解析)

ストリンジェントな条件下 [50% のホルムアミド、5 × S S P E (1 × S S P E の組成: 0. 1 5 M N a C l、1 0 m M N a H₂ P O₄、及び 1 m M E D T A ; p H 7. 4)、5 × デンハルト溶液、0. 2 % の S D S 及び 1 0 μ g / m L のニシン精子由来の D N A、4 2 ° C] において [α - ³² P] d C T P (Amersham 社製) で N a G L T 1 の c D N A (全長) を Prime-a-Gene Labeling System (Promega 社製) を用いて標識し、ラット各臓器から RNeasy mini RNA extraction kit (QIAGEN 社製) を用いて全 R N A を抽出し、をブロットしたナイロン膜 (Hybond N+ membrane: Amersham 社製) とハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションを行った後、2 × S S C (1 × S S C の組成: 0. 1 5 M N a C l、1 5 m M クエン酸ナトリウム、p H 7. 0) / 0. 1 % の S D S で 1 0 分間室温でブロットメンブレンを 2 度洗浄し、さらに 0. 5 × S S C / 0. 1 % S D S で 3 0 分間 4 2 ° C で 1 度洗浄した。洗浄したブロットメンブレンをイメージングプレートに 3 ~ 6 時間露出し、可視化されたバンドをイメージングプレートリーダーで読みとった後、Image Analyze II (富士フイルム社製) で画像処理を行った (BI0-imaging

Analyzer BAS-2000II システム、富士写真フイルム株式会社)。それぞれのバンドに相当する放射線強度は、Image Analyze II 上で数値定量化した。その結果、N a G L T 1 mRNA は、腎臓の皮質部及び髓質部に多く発現することが認められた (第 2 図 A)。

- 5 次に、R T - P C R 法で調べるため、ラット各組織 (脳、心臓、肺、肝臓、小腸、脾臓、腎臓の皮質部、腎臓の髓質部) から RNeasy mini kit (QIAGEN 社製) を用いて 1 μ g の全 R N A を得た後、SuperScript II reverse transcriptase (インビトロジェン社製) を用いて逆転写反応を行った。反応終了後残存 R N A を RNase H (インビトロジェン社製) で
- 10 分解した。得られた 1 本鎖 D N A を鋳型として、N a G L T 1、S G L T 1、S G L T 2 及び G A P D H に特異的なプライマー (下記の表 2 及び配列表の配列番号 1 3 ~ 2 0 参照) と Taq DNA polymerase (Takara 社製) を使用し、9 5 $^{\circ}$ C で 3 分間熱変性させた後、以下のサイクルを 3
- 15 5 回繰り返し増幅させた。サイクル: 9 4 $^{\circ}$ C で 1 分間の熱変性、5 8 $^{\circ}$ C で 1 分間アニーリング、7 2 $^{\circ}$ C で 1 分間の伸長反応により得られた R T - P C R 産物を 1 . 5 % のアガロースゲル上で分離した後、エチジウムブロマイドで染色、紫外線下で可視化した。その結果、腎臓 (皮質部、髓質部) で N a G L T 1 が高発現しており、腎臓以外にも、脳、肺及び肝臓でも検出限界以上の発現が認められた (第 2 図 B)。

(表 2)

プライマー	遺伝子(GenBank アクセッション番号)	(位置)	配列番号
NaGLT1 (AB089802)			
Sense 5' - TGGGACCCACATTTCCAGAC - 3'		(279-298)	13
Antisense 5' - TCTGAGGCGGCTTCAAAGGATC - 3'		(736-757)	14
rSGLT1 (D16101)			
Sense 5' - ATGGACAGTAGCACCTTGAGCC - 3'		(170-191)	15
Antisense 5' - TAGCCCCAGAGAAGATGTCTG C - 3'		(647-668)	16
rSGLT2 (U29881)			
Sense 5' - CATTGTCTCAGGCTGGCACTGG - 3'		(851-872)	17
Antisense 5' - GGACACTGCCACAATGAACACC - 3'		(1289-1310)	18
rGAPDH (M17701)			
Sense 5' - CCTTCATTGACCTCAACTAC - 3'		(131-150)	19
Antisense 5' - GGAAGGCCATGCCAGTGAGC - 3'		(705-724)	20

(マイクロダイセクション法によるラット腎尿細管分節の単離)

- 5 Wistar 系雄性ラット (7 週齢) をネンブタール麻酔下正中開腹し、左腎臓を露出させる。下大動脈の左腎動脈分岐点直前頭部側にて結紮する。下大動静脈を左右分岐点直前頭部側にて結紮し、左腎動脈直下尾部側において血管に小孔を開ける。続いてその小孔よりポリエチレン医療用チューブ (PE-50, Becton Dickinson 社製) を挿入し、10ml 容量のシリンジを用いて過加圧にならないように A 液 (130mM の NaCl、

5 mMのKCl、1 mMの NaH_2PO_4 、1 mMの硫酸マグネシウム、
1 mMの乳酸カルシウム、2 mMの酢酸ナトリウム、5.5 mM
D-glucose、10 mMのHEPES、pH 7.4) 10 mlで左腎を前灌
流する。灌流腎に鬱血等がないことを確認した後、B液(1 mg/ml
5 のcollagenase (type I, Sigma 社製)、1 mg/mlのウシ血清アルブ
ミン(BSA)(Sigma 社製)、10 mMのパナジル酸リボヌクレオシド
コンプレックス(インビトロジェン社製)含有A液) 10 mlで灌流し、
すばやく摘出する。

腎皮質から髄質にわたる角度で切断して厚さ1~1.5 mmの腎切片
10 を作る。得られた腎切片を100% O_2 を用いて酸素化しながらB液中
で37℃、30分間の振盪後、氷冷A液で腎切片を洗浄し、シリコナイ
ズした鋭利な針を用いて以下の尿細管各分節をそれぞれの構造的特徴を
基に顕微鏡で観察しながら分離する。単離した各ネフロン分節(糸球体、
近位曲尿細管、近位直尿細管、髄質ヘンレ太い上行脚、皮質ヘンレ太い
15 上行脚、皮質集合管、髄質外層集合管、髄質内層集合管)を糸球体は2
0個、その他の分節は8 mmを1サンプルとして、それぞれの分節サン
プルからRNeasy RNA mini kit (QIAGEN 社製)を用いて全RNAを抽出
した。得られた全RNAと下記の表3のプライマーセット(配列番号2
1~29)を用いてRT-PCRを行った(第3図)。その結果、NaGLT1
20 mRNAは他のSGLTと同様、近位曲尿細管及び近位直尿細管
で高発現することが明らかになった(第3図)。

(表 3)

プライマー	遺伝子(GenBankアクセッション番号)	(位置)	配列番号
NaGLT1 (AB089802)			
forward primer	5'- CCGGTGTCTCATTGTTGTTCT	(526-547)	21
reverse primer	5'- ACCCAAGGCGAACTGAAGTG	(618-638)	22
TaqMan probe	5'- ACAAAGGAGCCCCACATATTCAGGGCTT	(589-616)	23
rSGLT1 (D16101)			
forward primer	5'- CGAGGAGGACCCTAAAGATAGCA	(1912-1934)	24
reverse primer	5'- GAACAGGTCATATGCCTTCTGA	(1977-1999)	25
TaqMan probe	5'- TGAAATAGATGCAGAAGCCCCCAGAAAGG	(1936-1964)	26
rSGLT2 (U29881)			
forward primer	5'- AAAATACCGAGGAAGGAAGTCT	(2117-2138)	27
reverse primer	5'- GACAAATTGGCCACCATCTCG	(2193-2213)	28
TaqMan probe	5'- CCAGTCCATTTGATTGGTTGTCACTTACC	(2163-2191)	29

(NaGLT1 mRNA発現レベルの定量的解析)

Wistar系雄性ラット(7週齢)の腎臓由来全RNAを逆転写し(方法
 5 2参照)、得られた1本鎖DNAを鋳型として、NaGLT1、SGLT
 1、SGLT2及びGAPDHに特異的なプライマー及びTaqMan
 プロブ(表3参照)とUniversal master mix(Applied Biosystems
 社製)を使用し、ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemを用いて
 NaGLT1、SGLT1、SGLT2及びGAPDH mRNA発現量
 10 を定量した。なお、標準曲線を求めるため、リアルタイムPCRで増幅
 したPCR産物をpGEM-T Easy vector(Promega社製)に挿入し、大腸
 菌(DH-5α)に形質転換した。形質転換した大腸菌を一晩LB培地

(1 L中に10 gのバクトトリプトン、5 gのイーストエキストラクト及び10 gのNaCl、pH 7.2)で振盪培養し、NaGLT1、SGLT1、SGLT2及びGAPDHそれぞれの増幅産物(表2のプライマーセットで増幅したPCR断片)をコードしているプラスミドDNAの精製を行った。

それぞれの濃度をUV1200分光光度計(島津社製)で測定し、既知濃度の対照遺伝子として使用した。PRISM 7700で得られた結果は、標準曲線を用いて数値化した。なお、内部標準として用いたGAPDH発現量をリアルタイムPCR各反応内における鋳型RNA量の補正に用いた。その結果、NaGLT1 mRNA発現量は、腎皮質及び髄質のいずれにおいても、他のSGLTと比較して高発現することが示された(第4図)。

(NaGLT1の輸送基質)

アフリカツメガエル卵母細胞(以下卵母細胞と略す)発現系を用いて、NaGLT1の輸送活性について調べた。まず、種々の糖類の選択性について調べるためインビトロ合成NaGLT1 RNAを卵母細胞に注入し、2日間18℃でインキュベートした後実験に供した。放射性標識した単糖類(α -メチル-D-グルコピラノシド(α MeGlc:代謝抵抗性グルコース)、ガラクトース、フルクトース、マンノース、マンニトール及び2-デオキシグルコース)並びに2糖類(スクロース)を基質として調べた結果、 α MeGlc取り込みのみが、陰性対照として同時に調べた水注入卵母細胞と比較して有意に高かった(第5図)。従って、NaGLT1の輸送基質がグルコースであることが明らかになった。

(NaGLT1を介した α MeGlc輸送特性)

NaGLT1 cRNA注入細胞及び水注入卵母細胞の[U- 14 C]- α -メチル-D-グルコピラノシド(α MeGlc)、D-[1- 14 C]ガラクトース、D-[U- 14 C]マンノース、D-[U- 14 C]
5 フルクトース、[1, 2- 3 H]-2-デオキシグルコース、D-[1- 3 H]マンニトール、[U- 14 C]スクロースの取り込み活性を測定した。その際、96 mMのNaCl、2 mMのKCl、1.8 mMのCaCl₂、1 mMのMgCl₂、5 mMのHEPES (pH 7.4) からの緩衝液中でインキュベートした。また、細胞外Na⁺濃度依存性を行
10 う場合は、NaClの濃度を9.6~96 mMの間に調製し、96 mMに不足する分を塩化コリンで補うこととし、最終的な浸透圧を一定にした(第6図、第7図)。

次に、NaGLT1発現卵母細胞を用いて、 α MeGlc取り込みの濃度依存性について調べた結果、Km値は 3.71 ± 0.09 mMを示
15 した(第6図A)。また、NaGLT1を介した α MeGlc取り込みに対する細胞外Na⁺イオン濃度の影響について解析した。はじめに、rNaGLT1の α MeGlc取り込みに対する細胞外Na⁺の影響は、7 μ Mのvalinomycin添加により膜電位差を無くした状態で、細胞外Na⁺の濃度を0~96 mMまで変化させ検討した。インピトロ合成rNa
20 aGLT1 RNAを注入した細胞では細胞外Na⁺濃度依存的に α MeGlc取り込みは増大した。また、rNaGLT1の α MeGlc取り込みに対する用量依存性、あるいは細胞外Na⁺依存性の検討(第6図A、第6図C)より、各々のVmax値(最大輸送速度)、Km値を算出した。それらの値をもとにヒルプロット(横軸に変化させた基質またはイオンの濃度、縦軸にはそれぞれの基質(またはイオン)濃度の時の輸送速度VでVmaxを徐したものの対数値をとる。)を行い(第6図B、
25

第6図D)、ヒル係数を算出した。その結果、 α MeGlc、 Na^+ のヒル係数はそれぞれ1.06、1.00であり、 α MeGlcと Na^+ とのカップリング比は1:1であることが示された(第6図)。従ってNaGLT1は、細胞外 Na^+ イオン濃度依存的に機能するグルコーストランスポートであることが示唆された。

さらに、NaGLT1発現卵母細胞を介する $[^{14}\text{C}]$ 標識 α MeGlc取り込みに対する種々阻害剤の影響について調べた結果、非標識 α MeGlc、D-グルコース、2-デオキシグルコース及びフロリジンは極めて強い阻害効果を有していた。フルクトースやフロレチンは弱い阻害効果を有していた。一方、L-グルコース、3-O-メチルグルコース、ガラクトース及びマンノースはNaGLT1を介した α MeGlc取り込みに対して影響を示さなかった(第7図)。

(抗NaGLT1抗体の作製)

NaGLT1のアミノ酸配列を基に、C末端側のペプチド(H_2N -LPLDRKQEKSESGQ-COOH)(配列番号30)をN末端側をシステインとして作製した(サワディー・テクノロジー社に合成依頼)。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析の結果、合成されたペプチドの純度は92%であった。続いてヘモシアニン(keyhole limpet hemocyanin (Calbiochem-Behring社製))を用い、このペプチドとのコンジュゲートを作製した。コンジュゲートは1mlずつ10本に分注し凍結保存した。

コンジュゲートはFreund完全アジュバント(Difco社製)を用いて均一なエマルジョンを作った。雄性日本白色家兎(2kg)の前免疫血清を採取後、0.2mg/羽の割合で2週間間隔で免疫した。各免疫時に採血し、ELISA法により抗体価の解析を行った。最終的に十分な抗

体価が得られた後、全採血して抗血清として凍結保存した。

(イムノプロットによるNaGLT1の局在解析)

- ペントバルビタール麻酔下 Wistar 系雄性ラット (220~230 g) から各組織を取り出し、ホモジネートバッファー (230 mMのスクロース、5 mMのトリス/塩酸 (pH 7.5)、2 mMのエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、0.1 mM フッ化フェニルメチルスルフォニル (PMSE)) でホモジナイズした後、15分間の3000 gでの遠心分離を行った。上清を取り分け、さらに30分間の24500 gでの遠心分離を行い、沈殿物 (粗膜画分) を回収した。ラット腎刷子縁膜及び側底膜の調製はパーコール密度勾配遠心法 (Biochim Biophys Acta 773, 113-124, 1984) に従い同時調製した。膜サンプルはSDSサンプルバッファー (2%のSDS、125 mMのトリス、20%グルセロール) に可溶化しポリアクリルアミド電気泳動 (Nature 227, 680-685, 1970) を行った。
- 分子量マーカーには、Rainbow™ colored protein molecular weight markers [myosin (220,000), phosphorylase beta (97,400), BSA (66,000), ovalbumin (46,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (21,500), lysozyme (14,300)] (Amersham 社製) を使用した。泳動の後、PVD F膜 (Immobilon P、ミリポア社製) にタンパク質をトランスファー後、TBST (Tris buffered saline; 20 mMのTris/HCl (pH 7.5)、137 mMのNaCl、0.1%のTween 20) でリンスした。次に5%のBSA含有TBSTで室温2時間ブロッキングした後、5%BSA含有TBSTで希釈した抗血清 (1:2000) と4℃、一晚反応させ、その後TBSTで15分、3回膜を洗浄した。そしてECL化学発光キット (Amersham 社製) を用いてX線フィルム (富士フイルム社製) に感光させた。その結果、NaGLT1タン

パク質は腎臓刷子縁膜に局在することが明らかになった(第8図)。なお、第8図中の左側は、抗NaGLT1抗体のみと反応させた場合、右側は予め抗原ペプチドで処理した抗NaGLT1抗体で反応させた結果をそれぞれ示す。

5

(NaGLT1が媒介するHEK293細胞によるフルクトースの取込み)

糖類似体を含む緩衝液(0.1 mM、37 k B q / m l)とともに15分間、37℃でインキュベーションしたHEK293細胞について、
10 ベクター(白のカラム、0.8 μ g / ウェル)又はrNaGLT1 cDNA(黒のカラム、0.8 μ g / ウェル)のトランスフェクションから2日後に、取込み分析を行った。結果を、第9図(A)に示す。各カラムは3つの単層から得られた平均値 \pm S. E. M.を表す。*P<0.05という値は、ベクターでトランスフェクトしたHEK293細胞と
15 は有意に異なっていた(Student's unpaired t-test)。

また、rNaGLT1 cDNA(0.8 μ g / ウェル)でトランスフェクトしたHEK293細胞による[14 C]フルクトースの取込みを、インキュベーション緩衝液中、各種濃度(0.1~20 mM)について、15分間、37℃で分析し、ベクターでトランスフェクトしたHEK2
20 93細胞にて測定された取込み量を差し引いた。結果を、第9図(B)に示す。差込み図は、取り込みのEadie-Hofstee plotを示す。各ポイントは、3つの単層の平均値 \pm S. E. M.を表す。見かけ上の K_m 値及び V_{max} 値は、3回の個別実験により得られたものである。

(腎臓刷子縁膜小胞によるフルクトースの取込み)

25 100 mMのマンニトール及び10 mMのHEPES(pH 7.5)に懸濁した膜小胞(20 μ l)を、100 mMのマンニトール、200

mMのNaCl（黒の丸：●）又はKCl（白の丸：○）、4 mMの [^{14}C] フルクトース及び10 mMのHEPES（pH 7.5）を含む基質混合液（20 μl ）とともに、25℃でインキュベーションした。結果を、第10図（A）に示す。それぞれの値は、3回の個別実験の平均値 \pm S.E.M.を表す。各実験は、5匹のラットから単離した刷子縁膜小胞を用いて行われた。

腎臓刷子縁膜小胞によるフルクトースのNa⁺依存性の取り込みを、NaClの存在下において、各種濃度（0.1～20 mM）のインキュベーション緩衝液中で15秒間、25℃で分析し、NaClをKClで置換する場合の取込み量を差し引いた。結果を、第10図（B）に示す。差込み図は、取り込みのEadie-Hofstee plotを示す。各ポイントは、3回の測定の平均値 \pm S.E.M.を表す。見かけ上のK_m値及びV_{max}値は、3回の個別実験により得られたものである。

15 （rNaGLT1でトランスフェクトしたHEK293細胞又は腎臓刷子縁膜小胞による [^{14}C] フルクトースの取込みに対する、糖類似体フロリジン及びフロレチンの作用）

糖類似体（30 mM）であるフロリジン（50 μM ）又はフロレチン（50 μM ）のいずれかの存在下及び非存在下で、rNaGLT1でトランスフェクトしたHEK293細胞による [^{14}C] フルクトース（0.1 mM、37 kBq/ μl ）の取込みを、15分間、37℃で測定し、ベクターでトランスフェクトしたHEK293細胞にて測定された取込み量を差し引いた。糖類似体（30 mM）であるフロリジン（50 μM ）又はフロレチン（50 μM ）のいずれかの存在下及び非存在下で、10 mMのマンニトール及び10 mMのHEPES（pH 7.5）に懸濁した膜小胞（20 μl ）を、 [^{14}C] フルクトース（最終的に2 mM、

74 kBq/ml) 含む基質混合液 (20 μ l) とともに、15 秒間、25 $^{\circ}$ C でインキュベーションし、NaCl を KCl で置換する場合の取込み量を差し引いた。Na⁺ の非存在とは、NaCl を塩化コリンで置換するという条件で測定した取り込み量である。結果を、表 4 に示す。

- 5 それぞれの値は、3 回の個別実験の平均値 \pm S. E. M. を表す。* P < 0.05 という値は、コントロールの値とは有意に異なっていた (Fisher's t-test)。

(表 4)

10

処理	rNaGLT1 発現 HEK293 細胞による [14C]フルクトース取込み		腎刷子縁膜小胞による Na ⁺ 依存的な [14C]フルクトース取込み	
	pmol/mg protein/min	% of control	pmol/mg protein/sec	% of control
対照	2.92 \pm 0.04	100	49.5 \pm 3.6	100
Na ⁺ 非存在	0.16 \pm 0.20*	5	-0.2 \pm 1.3*	0
フルクトース	0.22 \pm 0.06*	8	5.4 \pm 2.1*	11
-MeGlc	1.24 \pm 0.13*	42	23.8 \pm 2.1*	48
ガラクトース	2.88 \pm 0.23	99	35.2 \pm 3.3	71
3-OMG	2.60 \pm 0.15	89	47.1 \pm 4.5	95
2-DG	2.04 \pm 0.19*	70	16.8 \pm 3.7*	34
スクロース	4.20 \pm 0.17*	144	47.3 \pm 6.0	96
2,5-AM	1.16 \pm 0.16*	40	38.6 \pm 2.6	78
フロリジン	0.34 \pm 0.11*	12	3.2 \pm 0.8*	6
フロレチン	0.97 \pm 0.09*	33	35.8 \pm 3.5	72

産業上の利用可能性

腎性糖尿病は、腎臓におけるグルコース再吸収不全によるものであり、該グルコース再吸収不全はグルコーストランスポータ遺伝子の欠損によると考えられていた。本発明により、従来不明であった遺伝子が取得されたことにより、該遺伝子及び該遺伝子の発現産物であるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータタンパク質を用いて、腎性糖尿病の解明、診断、予防・治療そのための薬剤の開発が可能となった。

例えば、本発明の遺伝子及びペプチド、更には該ペプチドに特異的に結合する抗体を用いて、例えば、ヒト腎におけるような新たなグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ遺伝子の単離を行うことや、ヒトやラット組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータの発現を測定することが、新規遺伝子の単離やグルコース及び／又はフルクトーストランスポータの機能の診断、腎臓における遺伝子疾患の検出が可能となる。

また、腎組織細胞のような組織細胞への本発明の遺伝子の導入や、本発明の遺伝子のアンチセンス鎖の導入による該遺伝子の発現抑制により、組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を調節することにより、腎遺伝子疾患の予防・治療を行うことも可能となる。更に、本発明の遺伝子の染色体上での欠損動物を作製することにより、グルコース及び／又はフルクトーストランスポータに着目した腎性糖尿病非ヒトモデル動物を作製することが可能である。該非ヒトモデル動物を用いることにより、腎性糖尿病の予防及び治療のための新規薬剤の開発が可能となる。

請 求 の 範 囲

1. 配列表の配列番号 1 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなることを特徴とする DNA。
2. 請求項 1 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチドをコードすることを特徴とする DNA。
3. 以下の (a) 又は (b) のポリペプチドをコードする DNA ;
- 10 (a) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド (b) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチド
- 15 4. 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とするポリペプチド。
5. 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチド。
- 20 6. 請求項 1 ～ 3 記載の DNA を、発現ベクターに組み込み、該組換え発現ベクターを宿主細胞に導入して発現することを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチドの製造法。
- 25 7. 請求項 4 又は 5 記載のポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体。

8. 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項7記載の抗体。

9. 抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項7記載の抗体。

5 10. 請求項1～3のいずれか記載のDNAを動物組織細胞に導入することを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法。

11. 物組織細胞が、ラット腎臓の組織細胞、ブタ腎臓由来上皮細胞、イヌ腎臓由来上皮細胞、又はフクロネズミ腎臓由来上皮細胞であることを特徴とする請求項10記載のグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法。

12. 動物組織細胞が、ヒト胎児腎臓の形質転換細胞株HEK293であることを特徴とする請求項10記載のグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法。

13. 請求項10～12のいずれか記載の方法により製造されたことを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞。

14. 請求項13記載のグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞を用いて、被研物質のグルコース輸送機能への影響を測定することを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能調節活性を有する物質のスクリーニング方法。

15. 配列表の配列番号2に示されるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能を染色体上で欠損させたことを特徴とする腎におけるグルコース再吸収能

不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物。

16. グルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能の欠損が、配列表の配列番号1に示されるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子の機能の欠損であることを特徴とする請求項15記載の腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物。

17. 請求項15又は16記載の腎におけるグルコース及び／又はフルクトース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物に、被検物質を投与し、該モデル非ヒト動物、或いは該モデル非ヒト動物の細胞、組織又は器官におけるグルコース再吸収能を測定・評価することを特徴とするグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病予防・治療薬のスクリーニング方法。

18. 請求項1記載の塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部からなるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能診断用プローブ。

19. 請求項1～3のいずれか記載のDNAの少なくとも1つ以上を固定化させたことを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能診断用マイクロアレイ又はDNAチップ。

20. 請求項7～9のいずれか記載の抗体及び／又は請求項18記載の診断用プローブを用意することを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能診断用薬剤。

21. 被検組織から試料を得、該試料における請求項1記載の遺伝子の発現を測定することを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能の診断方法。

22. 請求項21記載の遺伝子の発現の測定を、請求項18記載のグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能診断用プローブ、

或いは請求項 19 記載のグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能診断用マイクロアレイ又は DNA チップを用いて行うことを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能の診断方法。

- 5 23. 被検組織から試料を取得、培養し、該試料における遺伝子の発現により生成される請求項 4 記載のポリペプチドを測定することを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能の診断方法。

- 10 24. 請求項 23 記載のポリペプチドの測定を、請求項 7～9 のいずれか記載の抗体を用いて行うことを特徴とするグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能の診断方法。

- 15 25. 請求項 21～24 のいずれか記載のグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能の診断が、腎疾患におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能の測定であることを特徴とする腎疾患の診断方法。

26. 動物組織細胞に、請求項 1～3 のいずれか記載の DNA を導入することを特徴とする動物組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能の調節方法。

- 20 27. 動物組織細胞における請求項 1 記載の DNA の発現を抑制することを特徴とする動物組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能の調節方法。

- 25 28. 動物組織細胞における請求項 1 記載の DNA の発現の抑制が、請求項 1 記載の DNA 塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部を動物組織細胞に導入することにより行われることを特徴とする動物組織細胞グルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能の調節方法。

29. 動物組織細胞が、動物腎細胞であることを特徴とする請求項 2

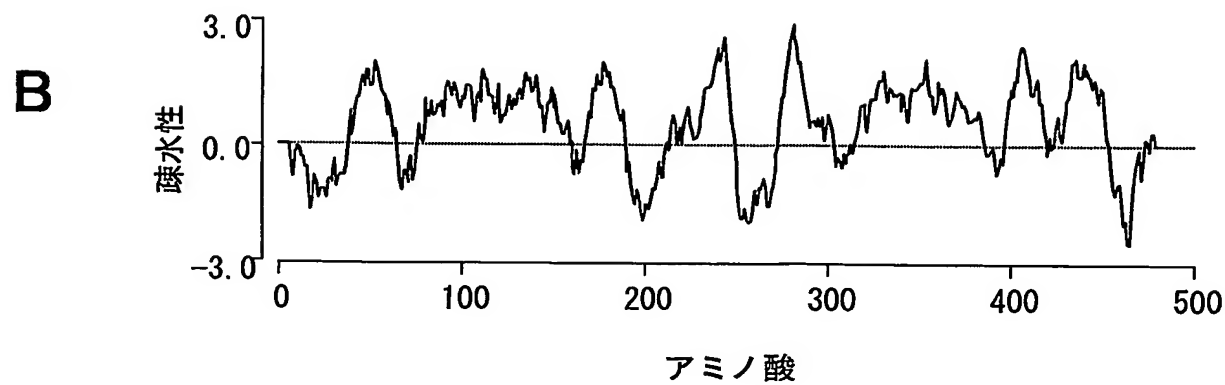
6 ～ 2 8 のいずれか記載の動物組織細胞におけるグルコース及び／又はフルクトーストランスポータ機能の調節方法。

第 1 図

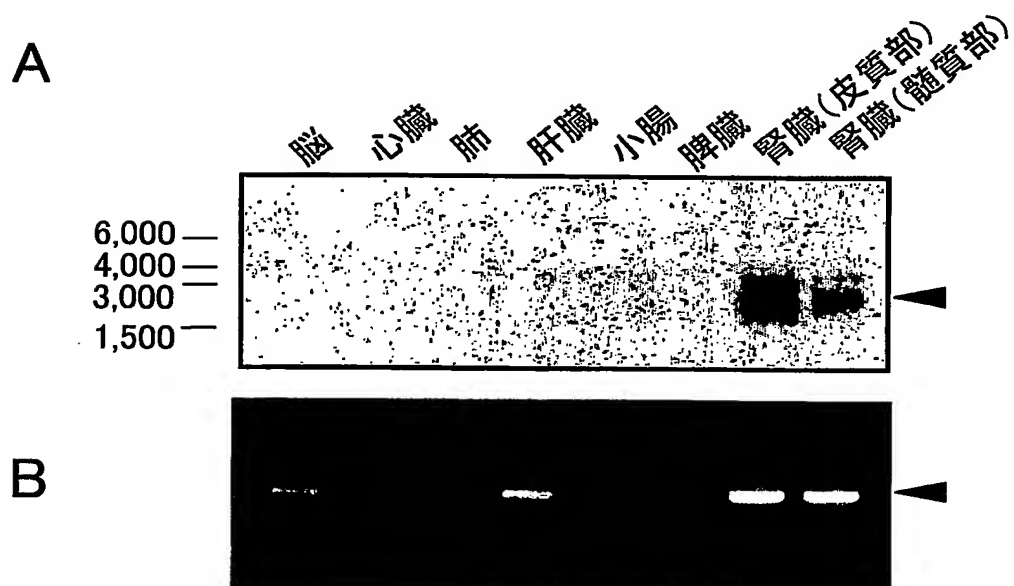
A

-11 0 AAA GA AT CT TC TG GT TA GA AA GA AC TG GG GC TC AG AG CT CC AG GG AC OC T - 61
 -6 0 G GC AA AA AG CT GG AC CT CA CC AA AA AC OC TT TG TC TG GA GC CA CC AA GC TG GG GT OG GA A -1
 1 A TG GA GT TC OG TG GG TC OG GG GC CA CT GC TG TT GA GC AG CA CC TC CT CC AG TC OG AG AC C 6 0
 M E F R G S G A T A V E Q H L L Q S E T
 61 C CA GG GA AG AA TG GG CT GC AG GC CA CA TC GA GT GA CC AA GT GG GA AG AA CA CT GC GC TG G 1 20
 P G K N G L Q A T S S D Q V G R T L R W
 121 T TC AC CA CT GT GG TT CT GA AT GC TG CT TT CC TG GG AA TG GG AG TG AG CG CT GC TG TG CT G 1 80
 F T T V V L N A A F L G M G V S A A V L
 181 G GA CC CA CA TT TC CA GA OC TG GC CA GA AA OG TG AA CC GG AA CA TC AG CA GC CT TT CC GAA 2 40
 G P T F P D L A R N V N R N I S S L S E
 241 A TC TT OG TG GG CC GA GC OC TC GG CT AC CT GG GC GC CT CT GT GG TT GG TG GG GT GC TT TT C 3 00
 I F V G R A L G Y L G G S V V G G V L F
 301 G AC TG CA TG AA TC AT TT TC TA CT TT TG GG GC TG TC CC AC CT GC TT AC TG OG GC OG GT CT T 3 60
 D C M N H F L L L G L S H L L T A A G L
 361 T AC CT CA CT CC TT TC TG TA AA AC AG CT GC CT TA CT GA CT GC CA TG AT GT CT AT TA CC GG T 4 20
 Y L T P F C K T A A L L T A M M S I T G
 421 G TC TC AT TT GG TG TT CT GT AT AC AG GT GG GA AT GT CC TC AT CT TG GA CC TT TG GG GG GA C 4 80
 V S F G V L D T G G N V L I L D L W G D
 481 A AA GG AG CC CC AC AT AT TC AG GC CT TG CA CT TC AG TT TC GC CT TG GG TG CC TT CC TG GC T 5 40
 K G A P H I Q A L H F S F A L G A F L A
 541 C CC CT GC TG GC TA AA TT GG CC TG GG GT AC CA CA GC AT CT GC TC AG AA CC AC AG AG CC T 6 00
 P L L A K L A W G T T A S A Q N H T E P
 601 C AG TT AG AC OG TT CA GC CT TG AA CC GA TC CT TT GA AG CC GC CT CA GA CT CT GT GT TG GC G 6 60
 Q L D R S A L N R S F E A A S D S V L A
 661 G TA CC TG AC GA CA TG AA TC TT CT GT GG GC GT AC GC TT CC AT TG GA AC CT AT GT TC TA GT A 7 20
 V P D D M N L L W A Y A S I G T Y V L V
 721 C TT TC TG TC TT CC TG TT TG CT CC AT TC TT TA AA AA GA GG TC AA AG CA GA AA AA AT CC GC A 7 80
 L S V F L F A P F F K K R S K Q K K S A
 781 G OG TC TG CT CA GG GA GC TC GA AG GG CT AA AT AC CA CA GG GC CC TG CT AT GC CT CC TC TT C 8 40
 A S A Q G A R R A K Y H R A L L C L F
 841 C TC TT CT TC TT CT TC TA OG TG GG AG OG GA GG TG AC CT AC GG CT CT TA OG TA TT CT CC TT C 9 00
 L F F F F Y V G A E V T Y G S Y V F S F
 901 G CC AC CA CC CA OG TT GG CA TG GA AG AG AG OG GC AG CT GG CT TG AA CT CC AT CT TC TG G 9 60
 A T T H V G M E E S E A A G L N S I F W
 961 G GG AC CT TC GC AG CC TG CA GG GG CC TG GC CA TC TT CT TC GC AA OG CT CT TA CA GC CT GG G 1 02 0
 G T F A A C R G L A I F F A T L L Q P G
 1021 A CC AT GA TG GT GT TG TG TA AC AT TG GC AG CC TG GC CT CA TC TT CT TT TC TG GT GC TT TT T 1 08 0
 T M M V L C N I G S L A S S F F L V L F
 1081 G AC AA GA GC CC TC TT TG CC TC TG GA TC GC GT CT TC TG TG TA TG GA GC CT CA AT GG CT GCC 1 14 0
 D K S P L C L W I A S S V Y G A S M A A
 1141 A OG TT TC CC AG OG GC AT CT CC TG GA TT GA GC AG TA CA CC AC CT TA AC TG GG AA AT CC GC T 1 20 0
 T F P S G I S W I E Q Y T T L T G K S A
 1201 G OG TT CA TT CT GG TT GG TG CT GC CC TG GC AC TA AT GG OG AC TC CT GC AT TA TC TG GA AT T 1 26 0
 A F I L V G A A L G L M A T P A L S G I
 1261 C TT CA GG GA CA CT AT CC OG AT CT GC CA GT AA TT CT GT AC AT GT GT CT GG GC TC AG CA GT A 1 32 0
 L Q G H Y P D L P V I L Y M C L G S A V
 1321 T TA AC AA CT GT GT TA TT CC CT GT GA TG TA AA GT AG CC AC CT TA CC TC TG GA TC GA AG 1 38 0
 L T T V L F P V M Y K V A T L P L D R K
 1381 C AG GA AA AA AG CA TC AA CA GT GA GG GC CA GA AA AT AT TA CT TT CT AG CT CT AG GC TA AT C 1 44 0
 Q E K S I N S E G Q K I L L S S S R L I
 1441 A AG GA AG CT AA AT GA AA GA GG AA GG AA AG GT GT GA AA GC AC GT GC GC GT GT GT GC G 1 50 0
 K E A K
 1501 C AT GC AC GC GC AC GC GT AA TG GT TT TG OG GT GG TT AA AA TG AA GA AT GG GA CA TT CT CT A 1 56 0
 1561 A TA AA AA TA CA AT AG AA AT GC CT TT AT AT AA CC CA TA GC TG AG GT CT CT AA GC AA CT CT C 1 62 0
 1621 C TG AA AT AT TC TG CA GC CA GG GT CT TC TC CA GC TG AC AG GG AG CA CG CA GT CA TG AG GC A 1 68 0
 1681 C CA GG TC TC CT GA GA CC CC TT AC AC TG CC CT CA TT GA AG TT AT CT CT CA GC CC AT GA TT C 1 74 0
 1741 T AG GA AA GA AA AG TA TT TC TA AA AT AA AA TC CA OG AC TT CC AG AG AT CC TG TA AG AC AG C 1 80 0
 1801 T CT GA GA CA TC AA TG TA AC TG CC AG CA CC TT CT TC AT TT CC AT GA AG TG AG AC AG AA C 1 86 0
 1861 A GA AA TA GT TT TA AA OG TA TG CT CC TG GG GC TG GT GA GA TG GC TT AG TG GT TA AG AG CA C 1 92 0
 1921 T GA CT GC TC TT CC AA AG GT CC TG AG TT CA AA TC CC AG CA AC CA TA TG GT GG CT CA CA AC T 1 98 0
 1981 A TC TG TA AT GA GA TC TG AT GC CT TC TT CT GG TG TG TC TG AA GA CA GC GA CA GT GT AC TC A 2 04 0
 2041 T AT AC AT CA AA TA AA TA AT AT TT 20 63

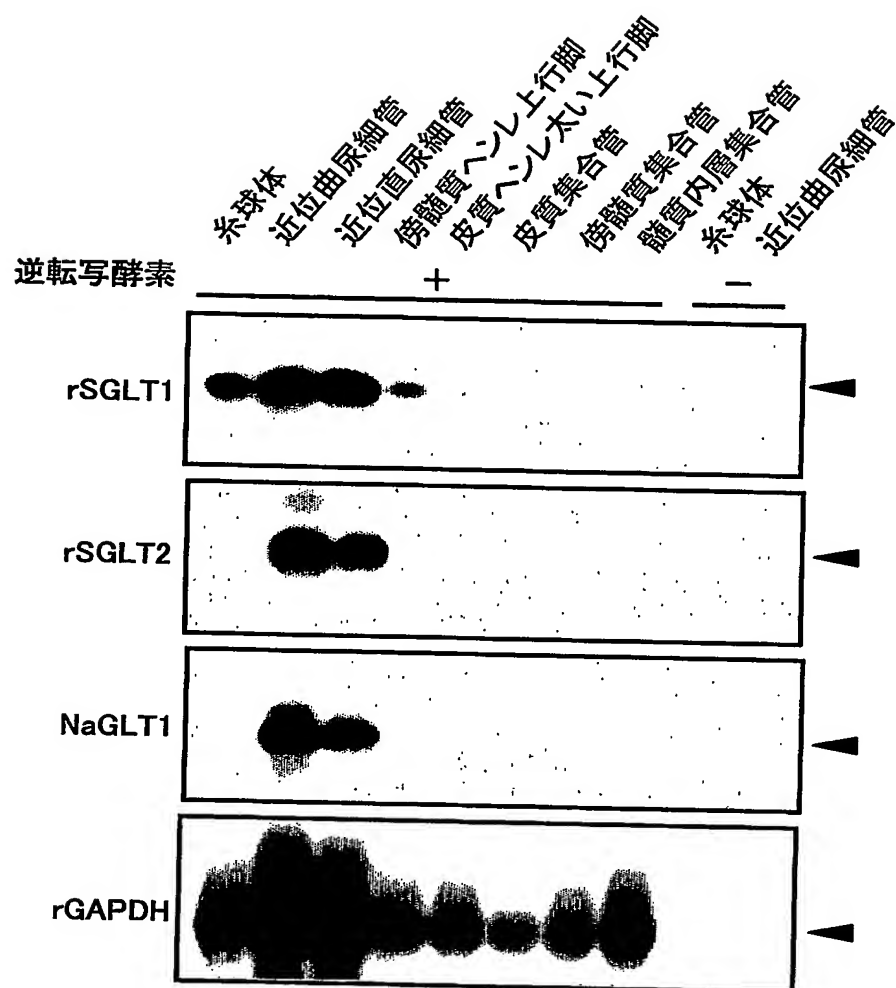
第 1 図 (つづき)



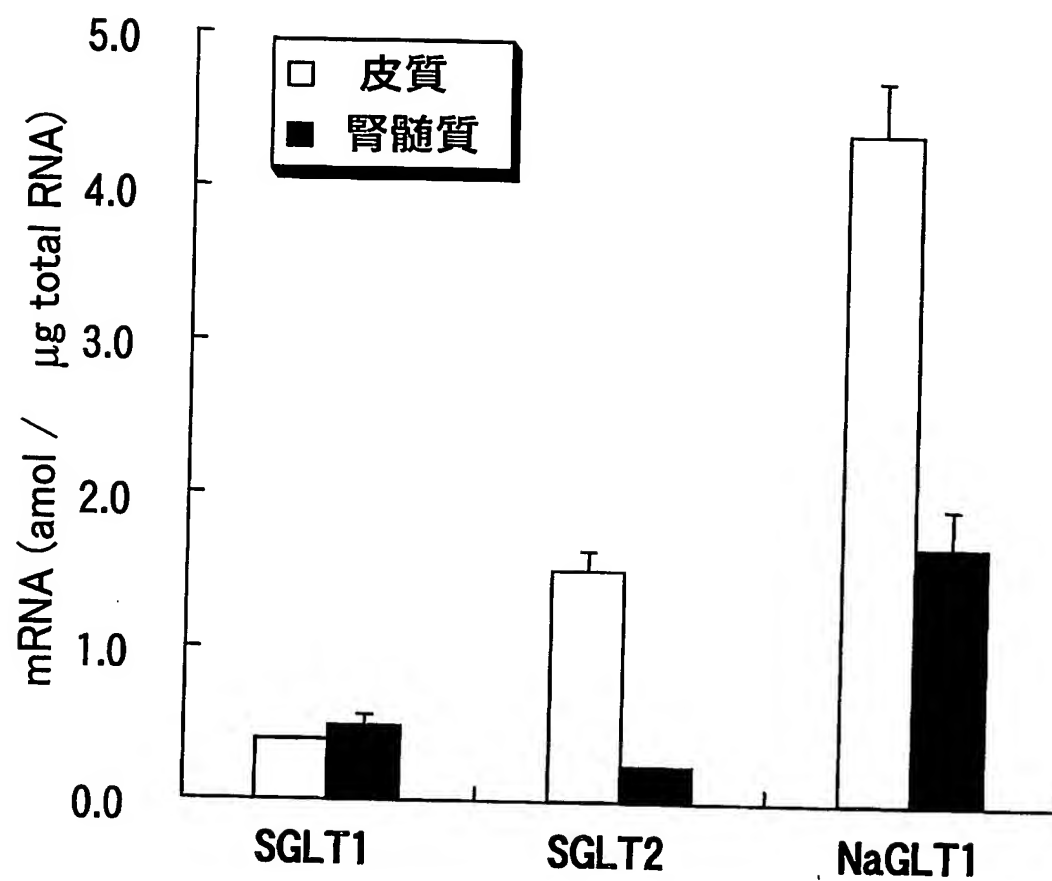
第 2 図



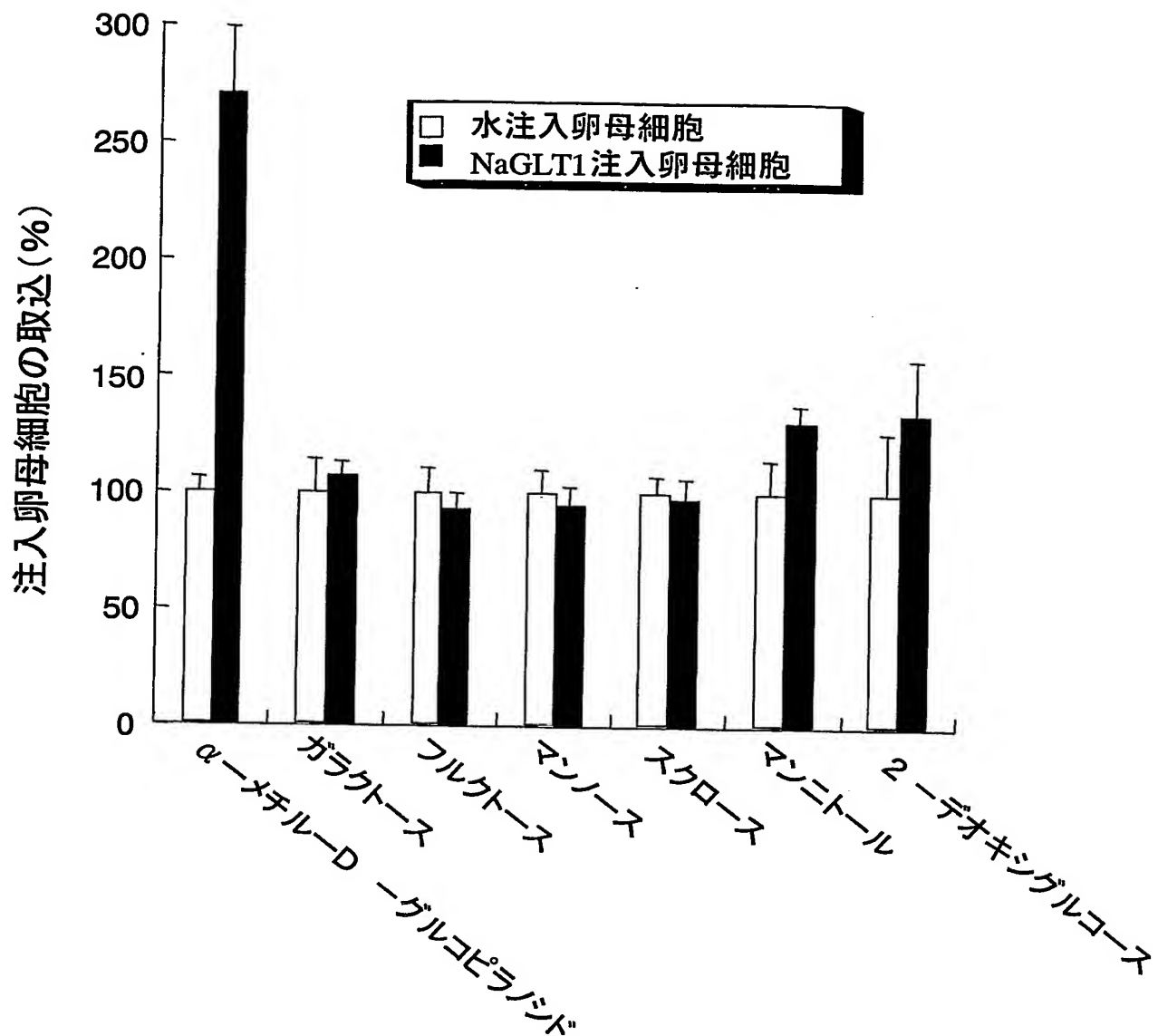
第 3 図



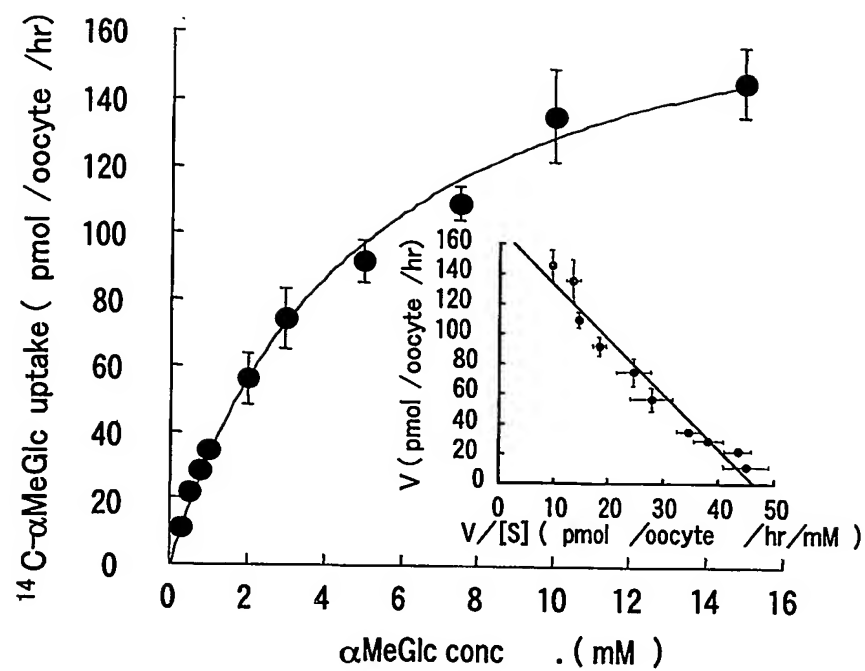
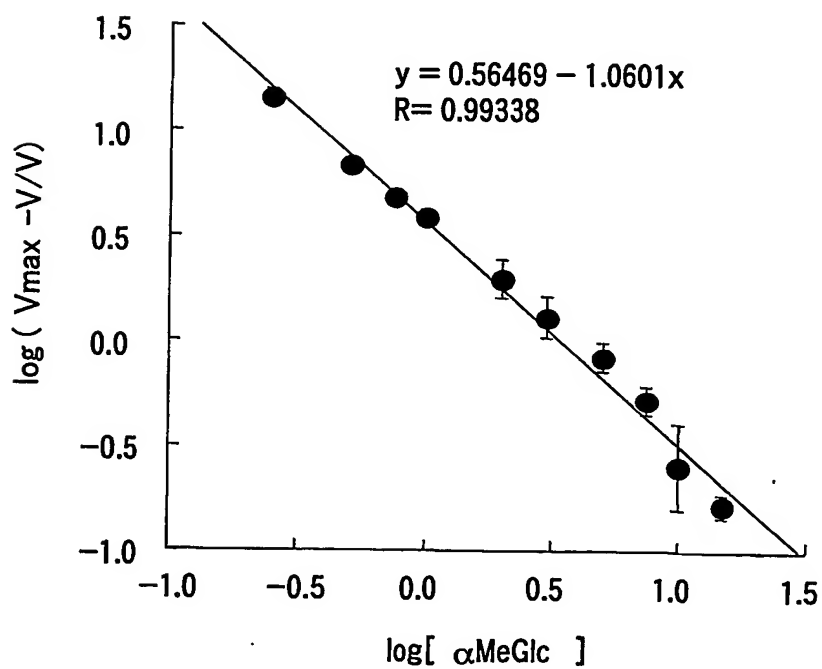
第 4 図



第 5 図

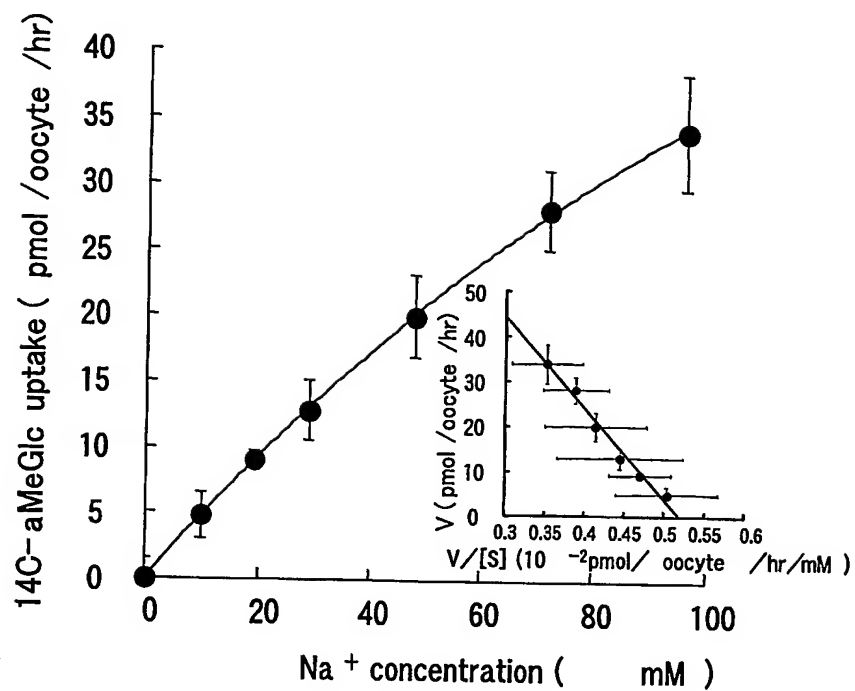


第 6 図

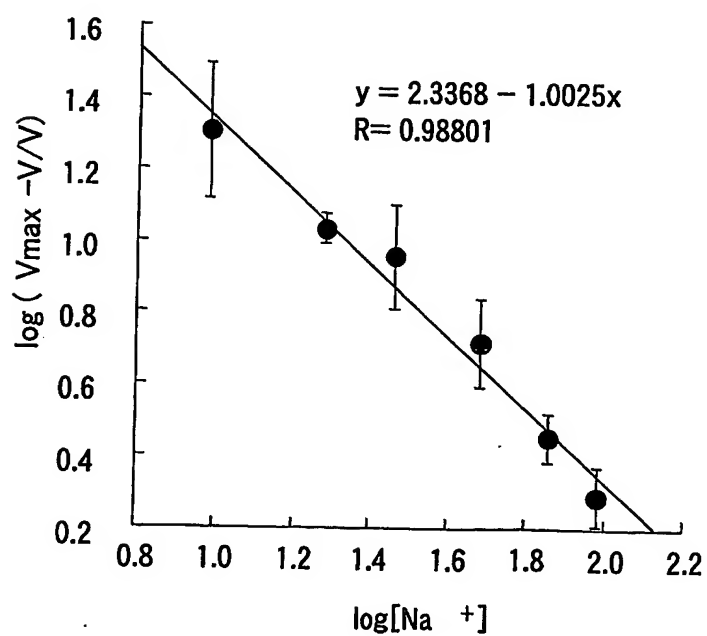
A**B**

第 6 図 (つづき)

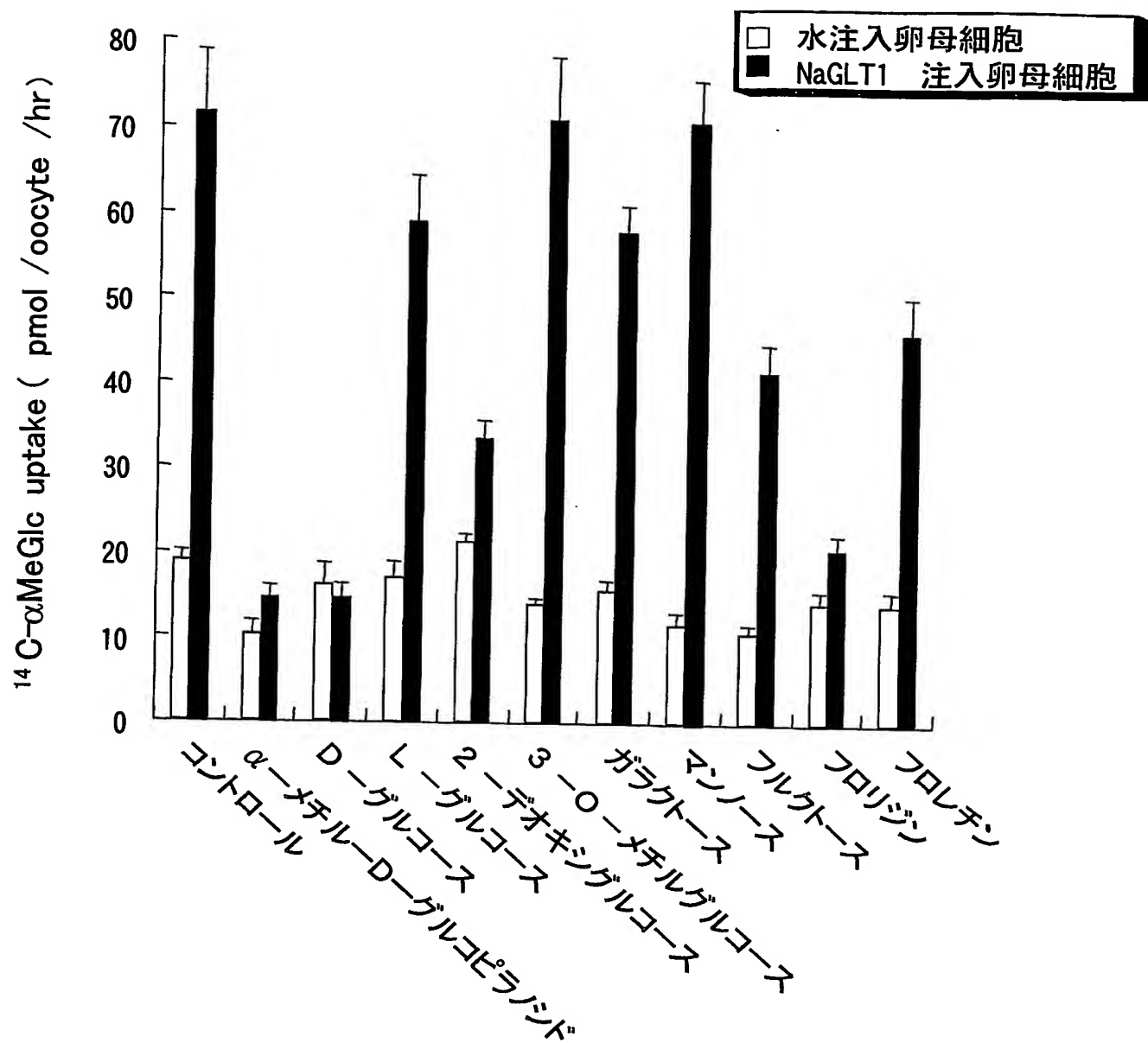
C



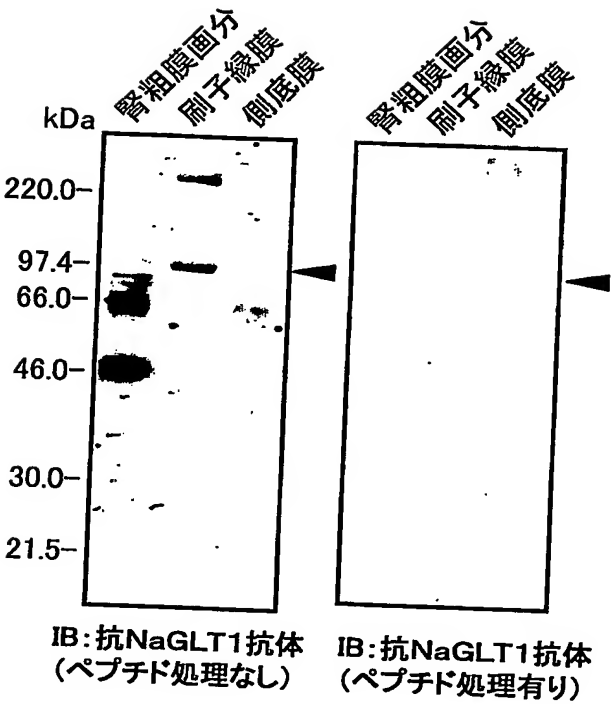
D



第 7 図

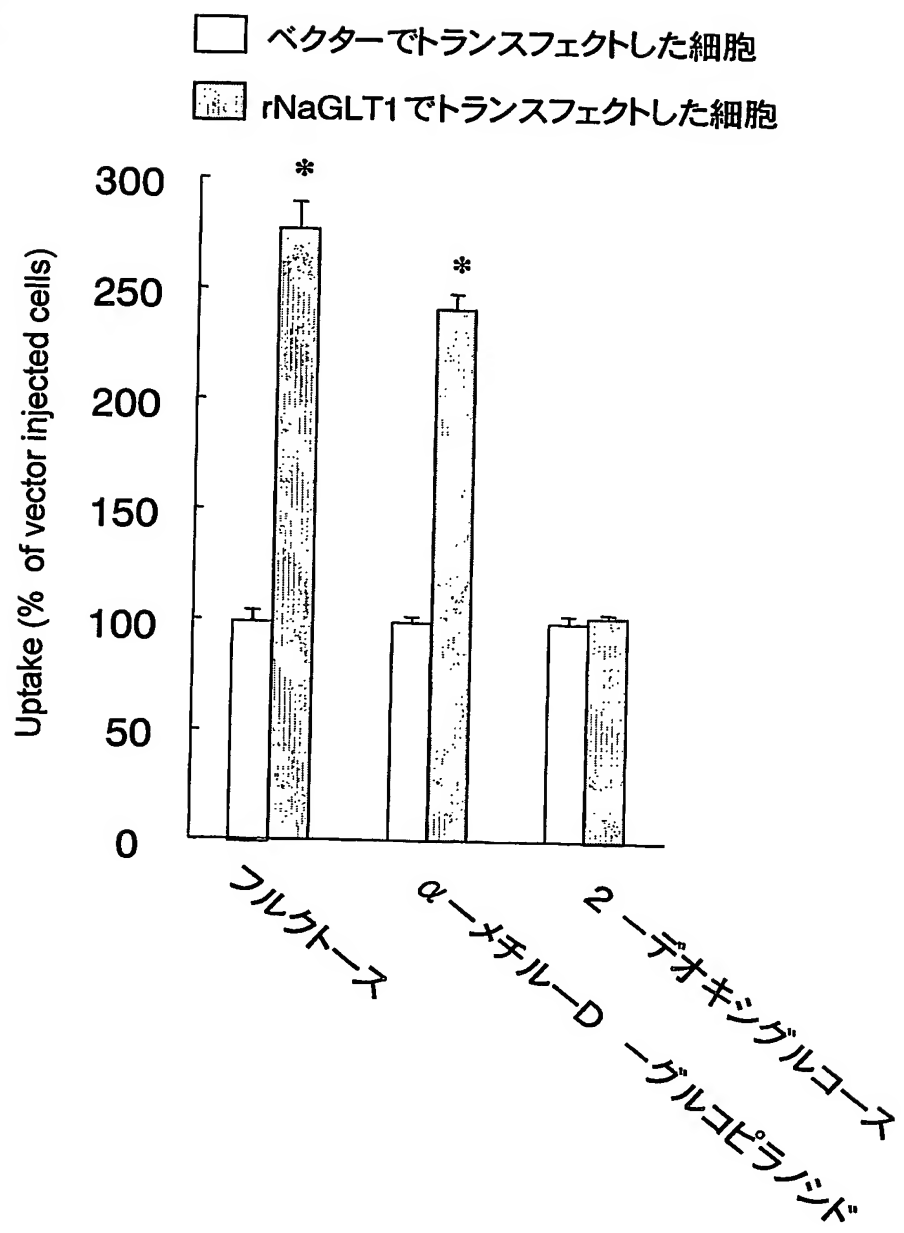


第 8 図

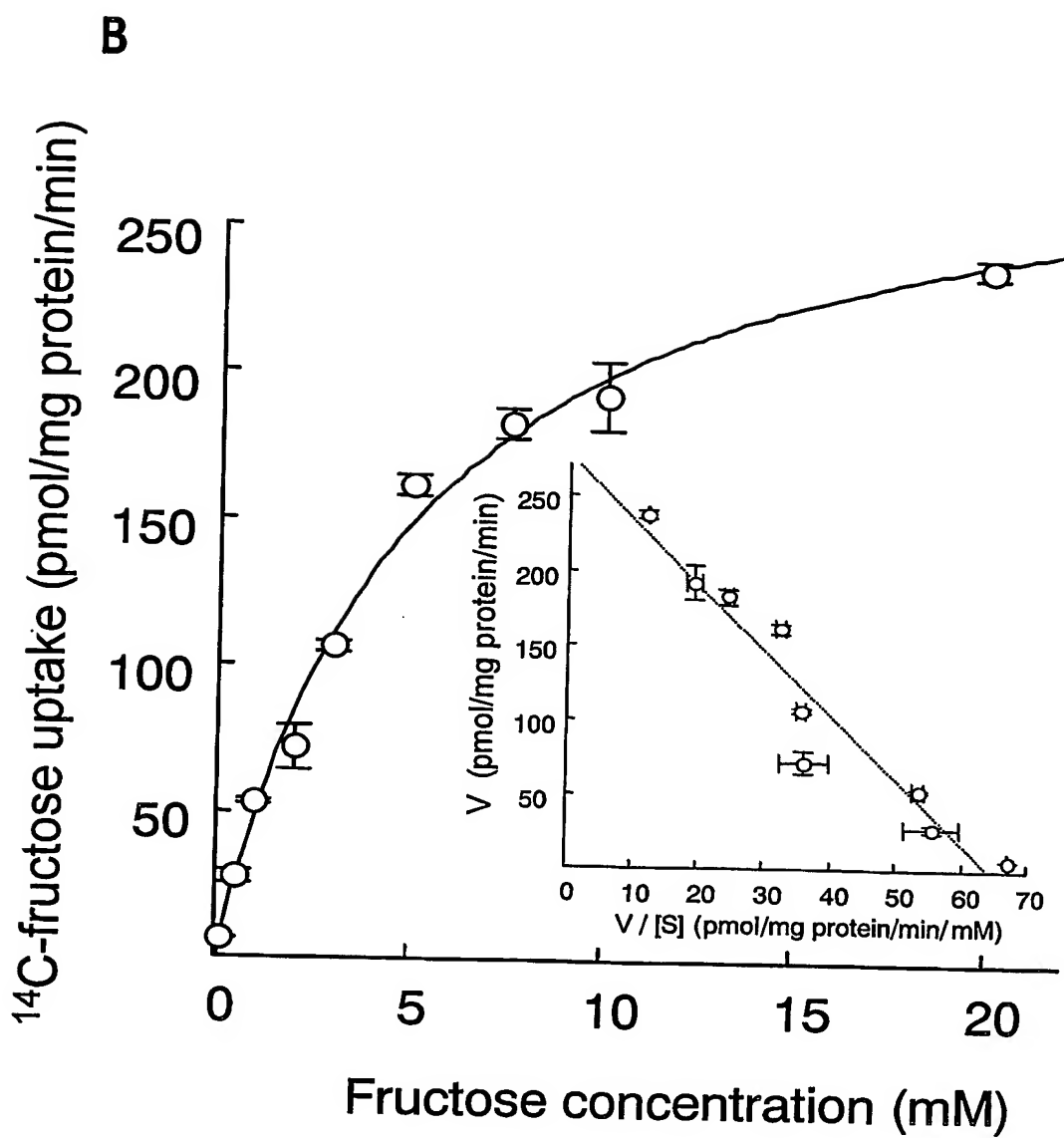


第 9 図

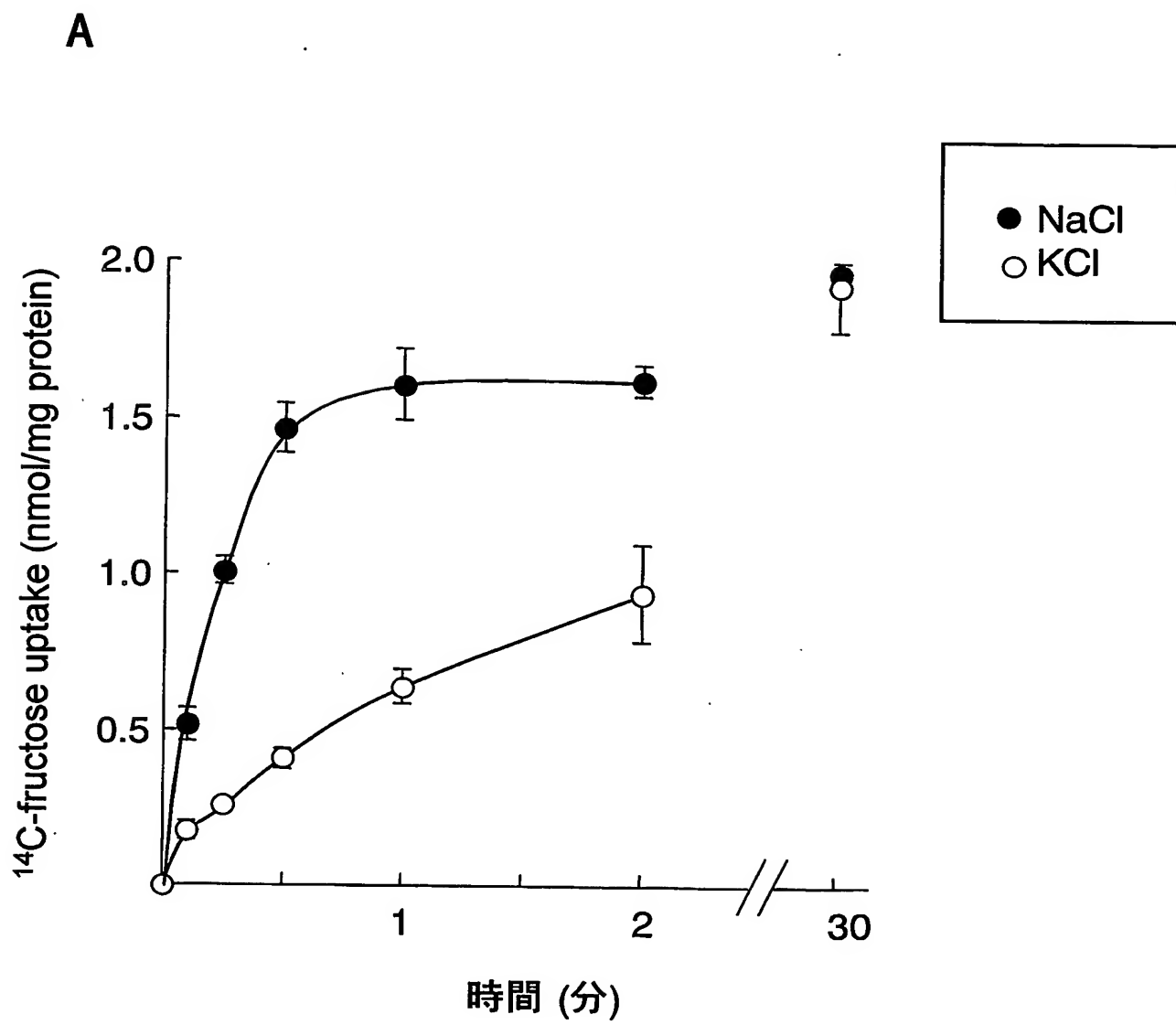
A



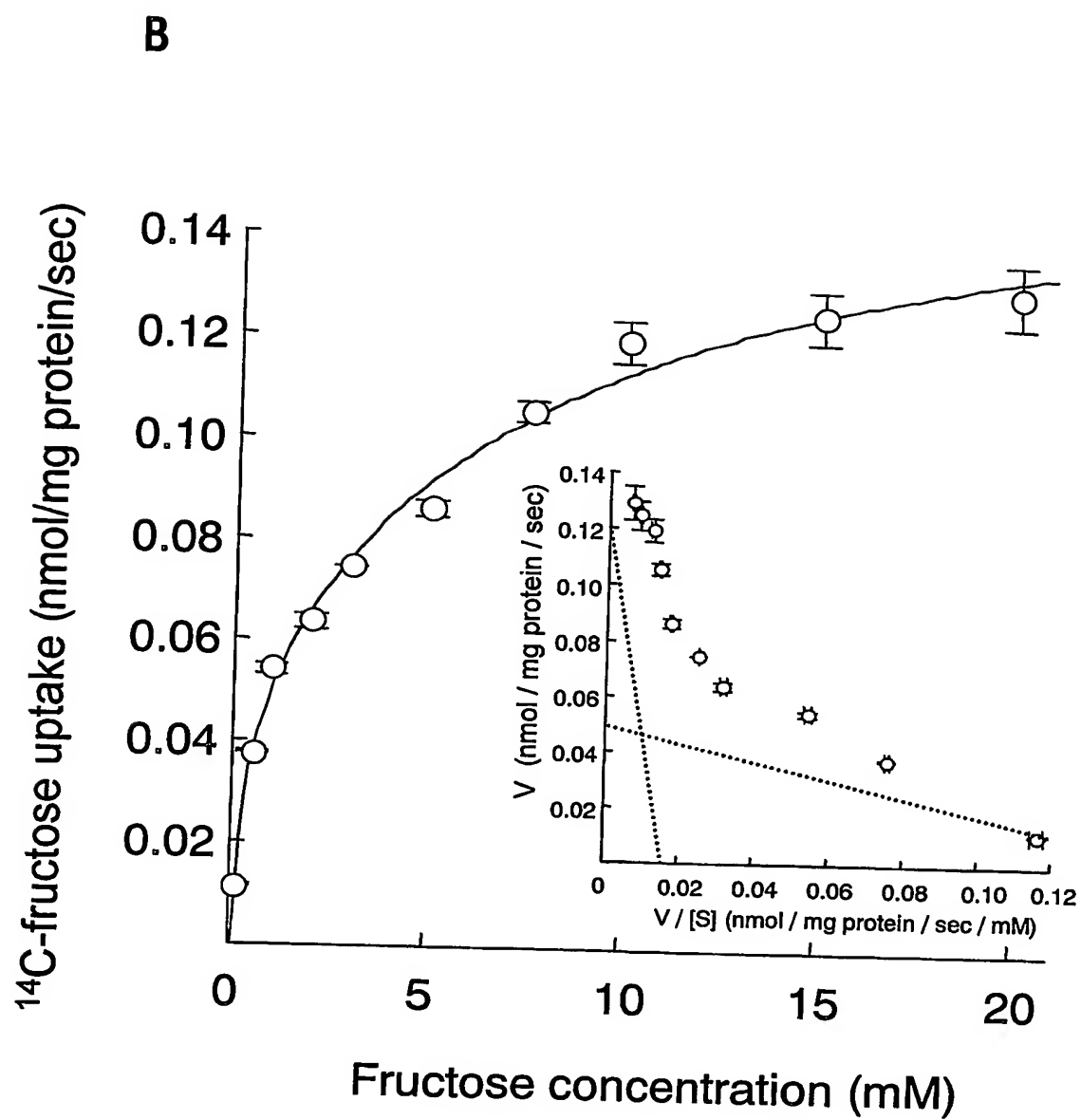
第 9 図 (つづき)



第 10 図



第 10 図 (つづき)



SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY

<120> Glucose and/or fructose transporter 'NaGLT1' and gene thereof

<130> YG2003-52PCT

<140>

<141>

<150> JP P2002-363014

<151> 2002-12-13

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2173

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (111)..(1562)

<400> 1

aaagaatcct cttgtagaa agaactgggg ctcagagctc cagggaccct ggcaaaaagc 60

tggaccctcac caaaaaccct ttgtctggag ccaccaagct ggggtcggaa atg gag 116

Met Glu

1

ttc cgt ggg tcc ggg gcc act gct gtt gag cag cac ctc ctc cag tcc 164

Phe Arg Gly Ser Gly Ala Thr Ala Val Glu Gln His Leu Leu Gln Ser

5

10

15

gag acc cca ggg aag aat ggg ctg cag gcc aca tcg agt gac caa gtg 212

Glu Thr Pro Gly Lys Asn Gly Leu Gln Ala Thr Ser Ser Asp Gln Val

20

25

30

gga aga aca ctg cgc tgg ttc acc act gtg gtt ctg aat gct gct ttc 260

Gly Arg Thr Leu Arg Trp Phe Thr Thr Val Val Leu Asn Ala Ala Phe

35

40

45

50

ctg gga atg gga gtg agc gct gct gtg ctg gga ccc aca ttt cca gac 308

Leu Gly Met Gly Val Ser Ala Ala Val Leu Gly Pro Thr Phe Pro Asp

55

60

65

ctg gcc aga aac gig aac cgg aac atc agc agc ctt tcc gaa atc ttc 356

Leu Ala Arg Asn Val Asn Arg Asn Ile Ser Ser Leu Ser Glu Ile Phe

70

75

80

gtg ggc cga gcc ctc ggc tac ctg ggc ggc tct gtg gtt ggt ggg gtg 404

Val Gly Arg Ala Leu Gly Tyr Leu Gly Gly Ser Val Val Gly Gly Val

85

90

95

ctt ttc gac tgc atg aat cat ttt cta ctt ttg ggg ctg tcc cac ctg 452

Leu Phe Asp Cys Met Asn His Phe Leu Leu Leu Gly Leu Ser His Leu

100

105

110

ctt act gcg gcc ggt ctt tac ctc act cct ttc tgt aaa aca gct gcc 500

Leu Thr Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Thr Pro Phe Cys Lys Thr Ala Ala

115

120

125

130

tta ctg act gcc atg atg tct att acc ggt gtc tca ttt ggt gtt ctg 548

Leu Leu Thr Ala Met Met Ser Ile Thr Gly Val Ser Phe Gly Val Leu

135

140

145

gat aca ggt ggg aat gtc ctc atc ttg gac ctt tgg ggg gac aaa gga 596

Asp Thr Gly Gly Asn Val Leu Ile Leu Asp Leu Trp Gly Asp Lys Gly

150

155

160

gcc cca cat att cag gcc ttg cac ttc agt ttc gcc ttg ggt gcc ttc 644

Ala Pro His Ile Gln Ala Leu His Phe Ser Phe Ala Leu Gly Ala Phe

165

170

175

ctg gct ccc ctg ctg gct aaa ttg gcc tgg ggt acc aca gca tct gct 692

Leu Ala Pro Leu Leu Ala Lys Leu Ala Trp Gly Thr Thr Ala Ser Ala

180

185

190

cag aac cac aca gag cct cag tta gac cgt tca gcc ttg aac cga tcc 740
 Gln Asn His Thr Glu Pro Gln Leu Asp Arg Ser Ala Leu Asn Arg Ser
 195 200 205 210

ttt gaa gcc gcc tca gac tct gtg ttg gcg gta cct gac gac atg aat 788
 Phe Glu Ala Ala Ser Asp Ser Val Leu Ala Val Pro Asp Asp Met Asn
 215 220 225

ctt ctg tgg gcg tac gct tcc att gga acc tat gtt cta gta ctt tct 836
 Leu Leu Trp Ala Tyr Ala Ser Ile Gly Thr Tyr Val Leu Val Leu Ser
 230 235 240

gtc ttc ctg ttt gct cca ttc ttt aaa aag agg tca aag cag aaa aaa 884
 Val Phe Leu Phe Ala Pro Phe Phe Lys Lys Arg Ser Lys Gln Lys Lys
 245 250 255

tcc gca gcg tct gct cag gga gct cga agg gct aaa tac cac agg gcc 932
 Ser Ala Ala Ser Ala Gln Gly Ala Arg Arg Ala Lys Tyr His Arg Ala
 260 265 270

ctg cta tgc ctc ctc ttc ctc ttc ttc ttc ttc tac gtg gga gcg gag 980
 Leu Leu Cys Leu Leu Phe Leu Phe Phe Phe Phe Tyr Val Gly Ala Glu
 275 280 285 290

gtg acc tac ggc tct tac gta ttc tcc ttc gcc acc acc cac gtt ggc 1028
 Val Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Phe Ser Phe Ala Thr Thr His Val Gly

295	300	305	
atg gaa gag agc gag gca gct ggc ttg aac tcc atc ttc tgg ggg acc 1076			
Met Glu Glu Ser Glu Ala Ala Gly Leu Asn Ser Ile Phe Trp Gly Thr			
310	315	320	
ttc gca gcc tgc agg ggc ctg gcc atc ttc ttc gca acg ctc tta cag 1124			
Phe Ala Ala Cys Arg Gly Leu Ala Ile Phe Phe Ala Thr Leu Leu Gln			
325	330	335	
cct ggg acc atg atg gtg ttg tgt aac att ggc agc ctg gcc tca tct 1172			
Pro Gly Thr Met Met Val Leu Cys Asn Ile Gly Ser Leu Ala Ser Ser			
340	345	350	
ttc ttt ctg gtg ctt ttt gac aag agc cct ctt tgc ctc tgg atc gcg 1220			
Phe Phe Leu Val Leu Phe Asp Lys Ser Pro Leu Cys Leu Trp Ile Ala			
355	360	365	370
tct tct gtg tat gga gcc tca atg gct gcc acg ttt ccc agc ggc atc 1268			
Ser Ser Val Tyr Gly Ala Ser Met Ala Ala Thr Phe Pro Ser Gly Ile			
375	380	385	
tcc tgg att gag cag tac acc acc tta act ggg aaa tcc gct gcg ttc 1316			
Ser Trp Ile Glu Gln Tyr Thr Thr Leu Thr Gly Lys Ser Ala Ala Phe			
390	395	400	
att ctg gtt ggt gct gcc ctg gga cta atg gcg act cct gca tta tct 1364			

Ile Leu Val Gly Ala Ala Leu Gly Leu Met Ala Thr Pro Ala Leu Ser
 405 410 415
 gga att ctt cag gga cac tat ccc gat ctg cca gta att ctg tac atg 1412
 Gly Ile Leu Gln Gly His Tyr Pro Asp Leu Pro Val Ile Leu Tyr Met
 420 425 430
 tgt ctg ggc tca gca gta tta aca act gtg tta ttc cct gtg atg tat 1460
 Cys Leu Gly Ser Ala Val Leu Thr Thr Val Leu Phe Pro Val Met Tyr
 435 440 445 450
 aaa gla gcc acc tta cct ctg gat cga aag cag gaa aaa agc atc aac 1508
 Lys Val Ala Thr Leu Pro Leu Asp Arg Lys Gln Glu Lys Ser Ile Asn
 455 460 465
 agt gag ggc cag aaa ata tta ctt tct agc tct agg cta atc aag gaa 1556
 Ser Glu Gly Gln Lys Ile Leu Leu Ser Ser Ser Arg Leu Ile Lys Glu
 470 475 480
 gct aaa tgaaagagga aggggaaagg tgtgaaagca cgtgcgcgcg tgtgtgcgca 1612
 Ala Lys
 tgcacgcgca cgcgtaatgg ttttgcggtg gttaaaatga agaattggac attctctaat 1672
 aaaaatacaa tagaaatgcc tttatataac ccatagctga ggtctctaaag caactctcct 1732
 gaaatattct gcagccaggg tcttctccag ctgacagga gcacgcagtc atgaggcacc 1792

aggctctccig agacccctta cactgccctc atgaagtta tcctcagcc catgattcta 1852

ggaaagaaaa gtatttctaa aataaaatcc acgacticca gagatcctgi aagacagctc 1912

tgagagatca atgtaactgc cagcaccttc ttcatctcca tgaagtgaga cacagaacag 1972

aaatagtttt aaacgtatgc tcciggggct ggtgagaagg cttagtgggt aagagcactg 2032

actgccttc caaaggctct gagttcaaat cccagcaacc acatggtagc tcacaactat 2092

ctgtaatgag atctgatgcc ttcttctggg gtgtctgaag acagcgacag tgtactcata 2152

tacatcaaat aaataatatt t 2173

<210> 2

<211> 484

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Met Glu Phe Arg Gly Ser Gly Ala Thr Ala Val Glu Gln His Leu Leu

1

5

10

15

Gln Ser Glu Thr Pro Gly Lys Asn Gly Leu Gln Ala Thr Ser Ser Asp

20

25

30

Gln Val Gly Arg Thr Leu Arg Trp Phe Thr Thr Val Val Leu Asn Ala
 35 40 45

Ala Phe Leu Gly Met Gly Val Ser Ala Ala Val Leu Gly Pro Thr Phe
 50 55 60

Pro Asp Leu Ala Arg Asn Val Asn Arg Asn Ile Ser Ser Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Phe Val Gly Arg Ala Leu Gly Tyr Leu Gly Gly Ser Val Val Gly
 85 90 95

Gly Val Leu Phe Asp Cys Met Asn His Phe Leu Leu Leu Gly Leu Ser
 100 105 110

His Leu Leu Thr Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Thr Pro Phe Cys Lys Thr
 115 120 125

Ala Ala Leu Leu Thr Ala Met Met Ser Ile Thr Gly Val Ser Phe Gly
 130 135 140

Val Leu Asp Thr Gly Gly Asn Val Leu Ile Leu Asp Leu Trp Gly Asp
 145 150 155 160

Lys Gly Ala Pro His Ile Gln Ala Leu His Phe Ser Phe Ala Leu Gly
 165 170 175

Ala Phe Leu Ala Pro Leu Leu Ala Lys Leu Ala Trp Gly Thr Thr Ala
180 185 190

Ser Ala Gln Asn His Thr Glu Pro Gln Leu Asp Arg Ser Ala Leu Asn
195 200 205

Arg Ser Phe Glu Ala Ala Ser Asp Ser Val Leu Ala Val Pro Asp Asp
210 215 220

Met Asn Leu Leu Trp Ala Tyr Ala Ser Ile Gly Thr Tyr Val Leu Val
225 230 235 240

Leu Ser Val Phe Leu Phe Ala Pro Phe Phe Lys Lys Arg Ser Lys Gln
245 250 255

Lys Lys Ser Ala Ala Ser Ala Gln Gly Ala Arg Arg Ala Lys Tyr His
260 265 270

Arg Ala Leu Leu Cys Leu Leu Phe Leu Phe Phe Phe Tyr Val Gly
275 280 285

Ala Glu Val Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Phe Ser Phe Ala Thr Thr His
290 295 300

Val Gly Met Glu Glu Ser Glu Ala Ala Gly Leu Asn Ser Ile Phe Trp
305 310 315 320

Gly Thr Phe Ala Ala Cys Arg Gly Leu Ala Ile Phe Phe Ala Thr Leu
325 330 335

Leu Gln Pro Gly Thr Met Met Val Leu Cys Asn Ile Gly Ser Leu Ala
340 345 350

Ser Ser Phe Phe Leu Val Leu Phe Asp Lys Ser Pro Leu Cys Leu Trp
355 360 365

Ile Ala Ser Ser Val Tyr Gly Ala Ser Met Ala Ala Thr Phe Pro Ser
370 375 380

Gly Ile Ser Trp Ile Glu Gln Tyr Thr Thr Leu Thr Gly Lys Ser Ala
385 390 395 400

Ala Phe Ile Leu Val Gly Ala Ala Leu Gly Leu Met Ala Thr Pro Ala
405 410 415

Leu Ser Gly Ile Leu Gln Gly His Tyr Pro Asp Leu Pro Val Ile Leu
420 425 430

Tyr Met Cys Leu Gly Ser Ala Val Leu Thr Thr Val Leu Phe Pro Val
435 440 445

Met Tyr Lys Val Ala Thr Leu Pro Leu Asp Arg Lys Gln Glu Lys Ser
450 455 460

Ile Asn Ser Glu Gly Gln Lys Ile Leu Leu Ser Ser Ser Arg Leu Ile
 465 470 475 480

Lys Glu Ala Lys

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-1 forward
 primer

<400> 3

tcggaaatgg agttccgtgg

20

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-2 forward
primer

<400> 4

agctgcctta ctgactgcca tg

22

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-3 forward
primer

<400> 5

tacgtattct ccttcgccac c

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-4 forward

primer

<400> 6

tgtgtaacat tggcagcctg g

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-5 forward
primer

<400> 7

taacccatag ctgaggcttc

20

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-1 reverse
primer

<400> 8

cagatagttg tgagccacca tgtg

24

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-2 reverse
primer

<400> 9

gagttgctta gagacctcag c

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-3 reverse
primer

<400> 10

aggtaggtgta ctgctcaatc c

21

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-4 reverse
primer

<400> 11

tctgaggcgg cttaaagga tc

22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-5 reverse
primer

<400> 12

aaaagcacc caccaaccac ag

22

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1 sense
primer

<400> 13

tgggaccac atttcagac

20

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1
antisense primer

<400> 14

tctgaggcgg ctccaagga tc

22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT1
sense primer

<400> 15

atggacagta gcaccttgag cc

22

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence::Rat SGLT1
antisense primer

<400> 16

tagccccaga gaagatgtct gc

22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2 sense
primer

<400> 17

catgtctca ggctggcact gg

22

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2
antisense primer

<400> 18

ggacactgcc acaatgaaca cc

22

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat GAPDH sense
primer

<400> 19

ccttcattga cctcaactac

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat GAPDH
antisense primer

<400> 20

ggaaggccat gccagtgagc

20

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1 forward
primer

<400> 21

ccgggtgtctc atttggtgtt ct

22

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1 reverse
primer

<400> 22

acccaaggcg aaactgaagt g

21

<210> 23

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1 TaqMan
probe

<400> 23

acaaaggagc cccacatatt caggcctt

28

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT1
forward primer

<400> 24

cgaggaggac cctaaagata cca

23

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT1
reverse primer

<400> 25

gaacaggtca tatgccttcc tga

23

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT1
TaqMan probe

<400> 26

tgaaatagat gcagaagccc cccagaagg

29

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2
forward primer

<400> 27

aaaatacggc aggaaggaac tg

22

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2
reverse primer

<400> 28

gacaaattgg ccaccatcctt g

21

<210> 29

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2

TaqMan probe

<400> 29

ccagtcatt tgattggttg tcattccc

29

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1

C-terminal peptide

<400> 30

Leu Pro Leu Asp Arg Lys Gln Glu Lys Ser Ile Asn Ser Glu Gly Gln

1

5

10

15 .

特許協力条約に基づく国際出願願書

YG2003-52PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2003年12月02日 (02.12.2003) 火曜日 14時37分07秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、 独立行政法人科学技術振興機構は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。 その他：電気通信回路を通じた発表行為
VIII-5-1 (i)	開示の種類	
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2003年06月02日 (02.06.2003)
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	FEBS Letters, 546, 276-280, 2003 [online]
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	Federation of European Biochemical Societies http://www.elsevier.nl/febs/1207/19/show/toc.htm
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2003年07月10日 (10.07.2003)
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	FEBS Letters, 546, 276-280, 2003
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	Federation of European Biochemical Societies
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	国内特許又は広域特許のための CA JP US の指定

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15418

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12Q1/68, C07K14/705, C07K16/28,
C12P21/02, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53,
G01N33/566, G01N37/00, A01K67/027, A61K31/7088, A61K38/00,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12Q1/68, C07K14/705, C07K16/28,
C12P21/02, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53,
G01N33/566, G01N37/00, A01K67/027, A61K31/7088, A61K38/00,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus(JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 10126344 A1 (Max-Planck-Gesellschaft zur Forderung der Wissenschaften E.V.), 24 January, 2002 (24.01.02), Seq. No. [0111] & WO 02/06479 A2	1-20, 26-29
A	Charron M.J. et al., A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues, Pro.Natl.Acad.Sci.USA, 1989, Vol.86, No.8, pages 2535-9	1-20, 26-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 January, 2004 (06.01.04)

Date of mailing of the international search report
20 January, 2004 (20.01.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15418

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (International Patent Classification (IPC))

Int.Cl⁷ A61K48/00, A61P3/10, A61P13/12, A61P43/00

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched (International Patent Classification (IPC))

Int.Cl⁷ A61K48/00, A61P3/10, A61P13/12, A61P43/00

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15418

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 21 to 25

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It involve diagnostic methods to be practiced on the human body.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12Q1/68, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566, G01N37/00, A01K67/027, A61K31/7088, A61K38/00, A61K48/00, A61P3/10, A61P13/12, A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12Q1/68, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566, G01N37/00, A01K67/027, A61K31/7088, A61K38/00, A61K48/00, A61P3/10, A61P13/12, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JSTPlus(JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	DE 10126344 A1 (Max-Planck-Gesellschaft zur Forderung der Wissenschaften E. V.) 2002. 01. 24, seq. 111 & WO 02/06479 A2	1-20, 26-29
A	Charron M. J. et al., A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, Vol. 86, No. 8, pages 2535-9	1-20, 26-29

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 01. 04

国際調査報告の発送日

20. 1. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4 N 3 1 2 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 21-25 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、

人の診断方法を含むものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。